

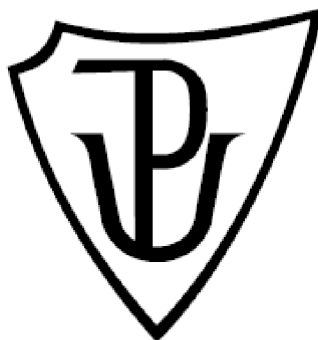
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Michaela Soldánová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Indukce apoptózy a genotoxického poškození
indolovými deriváty v buňkách rakoviny prostaty**

Bakalářská práce

Michaela Soldánová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela SOLDÁNOVÁ**
Osobní číslo: **R20724**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Indukce apoptózy a genotoxického poškození indolovými deriváty v buňkách rakoviny prostaty**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
- 2) Stanovení aktivity kaspáz v buňkách rakoviny prostaty
- 3) Stanovení hladiny proteinů p53, PARP metodu western blotting
- 4) Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- 1) Nichols WK et al: 3-Methylindole-Induced Toxicity to Human Bronchial Epithelial Cell Lines. *Toxicological Sciences*, 2003
- 2) Weems JM et al: Potent Mutagenicity of 3-Methylindole Requires Pulmonary Cytochrome P450-Mediated Bioactivation: A Comparison to the Prototype Cigarette Smoke Mutagens B(a)P and NNK. *Chemical Research in Toxicology*, 2010
- 3) Weems JM et al: 3-Methylindole is Mutagenic and a Possible Pulmonary Carcinogen. *Toxicological Science*, 2009
- 4) Weems JM and Yost GS: 3-Methylindole Metabolites Induce Lung CYP1A1 and CYP2F1 Enzymes by AhR and Non-AhR Mechanisms, Respectively. *Chemical Research in Toxicology*, 2010
- 5) Regal et al: Detection and Characterization of DNA Adducts of 3-Methylindole. *Chemical Research in Toxicology*, 2010

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 30. září 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 6. října 2021

Bibliografické údaje:

| | |
|---------------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Michaela Soldánová |
| Název práce: | Indukce apoptózy a genotoxického poškození indolovými deriváty v buňkách rakoviny prostaty |
| Typ práce: | Bakalářská |
| Pracoviště: | Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci |
| Vedoucí práce: | doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2023 |
| Abstrakt: | <p>Tato bakalářská práce se zabývá vlivem indolových derivátů na buňky rakoviny prostaty a jejich schopností vyvolat genotoxické poškození vedoucí ke spuštění apoptotických drah. V teoretické části je popsána apoptóza, její dráhy a regulace. Dále je popisována rakovina prostaty od diagnostiky a léčby k molekulárním mechanismům. Nakonec jsou popsány indoly a jeho deriváty z pohledu výskytu, syntézy a působení v buňce. Experimentální část se zabývá vlivem použitých indolových derivátů na indukci apoptózy prostřednictvím fluorimetricky stanovené aktivity kaspázy 3 a detekcí určitých s apoptózou spojených proteinů pomocí metody Western blot.</p> |
| Klíčová slova: | apoptóza, methylindoly, rakovina prostaty, AhR, AR |
| Počet stran: | 36 |
| Počet příloh: | 0 |
| Jazyk: | Český |

Bibliographical identification:

Author's name and surname: Michaela Soldánová

Title: Indole derivatives as apoptosis inducers and genotoxic agents in prostatic cancer cells

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacky University Olomouc

Supervisor: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract: This bachelor thesis deals with the effect of indole derivatives on prostate cancer cells and their ability to induce genotoxic damage leading to the activation of apoptotic pathways. Apoptosis, its pathways and regulation are described in the theoretical part. Next, prostate cancer is described from diagnosis and treatment to molecular mechanisms. Finally, indole and its derivatives are described from the point of view of occurrence, synthesis and action in the cell. The experimental part deals with the effect of the used indole derivatives on the induction of apoptosis through fluorimetrically determined caspase 3 activity and the detection of certain proteins related with apoptosis using the Western blot method.

Keywords: apoptosis, methylindols, prostate cancer, AhR, AR

Number of pages: 36

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. s vyznačenými použitými prameny.

V Olomouci dne.....

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu práce doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a vstřícný přístup při psaní bakalářské práce a vedení v laboratoři při zpracování experimentů. Dále bych chtěla poděkovat paní Mgr. Elišce Zgarbové za dohled a cenné rady při práci. Děkuji také všem zaměstnancům katedry buněčné biologie a genetiky za pomoc.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod | 1 |
| 2. Cíle práce..... | 2 |
| 3. Apoptóza | 3 |
| 3.1. Vnitřní a vnější dráha iniciace apoptózy | 3 |
| 3.2. Spouštěče (genotoxický stres) | 5 |
| 3.3. Exekutory..... | 5 |
| 3.4. Regulace | 6 |
| 4. Rakovina prostaty..... | 8 |
| 4.1. Diagnostika..... | 8 |
| 4.2. Léčba | 10 |
| 4.3. Významné molekulární mechanismy | 12 |
| 5. Indoly | 13 |
| 5.1. Vliv na buněčné úrovni..... | 13 |
| 5.2. Testované indolové látky..... | 14 |
| 6. Materiál a metody..... | 16 |
| 6.1. Biologický materiál | 16 |
| 6.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky | 16 |
| 6.3. Seznam použitých přístrojů | 18 |
| 6.4. Použitý software | 18 |
| 6.5. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy | 19 |
| 6.5.1. Příprava kultivačního média..... | 19 |
| 6.5.2. Pasážování, počítání a vyšetí buněk..... | 19 |
| 6.5.3. Inkubace s testovanými látkami | 20 |
| 6.5.4. Caspase 3 Assay | 21 |
| 6.5.5. Izolace proteinů a stanovení koncentrace..... | 22 |
| 6.5.6. SDS-PAGE..... | 22 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 6.5.7. Western blotting | 24 |
| 7. Výsledky..... | 25 |
| 7.1. Aktivita kaspázy | 25 |
| 7.2. Western Blot | 27 |
| 8. Diskuse | 29 |
| 9. Závěr..... | 31 |
| 10. Literatura | 32 |

Seznam symbolů a zkratk

| | |
|--------------|---|
| 3MI | 3-methylindol, skatol |
| AhR | aryl uhlovodíkový receptor |
| APAF1 | apoptotic protease activating factor- 1 |
| AR | androgenní receptor |
| BH3 | Bcl-2 homologní doména 3 |
| CAD | kaspázou aktivovaná DNáza |
| CRPC | kastračně rezistentní karcinom prostaty |
| DED | efektorová doména receptoru smrti |
| DRE | digitální rektální vyšetření |
| FADD (MORT1) | adaptorový protein domény smrti |
| FLIP | FLICE- inhibitorový protein |
| I3C | indol-3-karbinol |
| IAA | kyselina indol-3-ctová |
| IAP | proteiny inhibující apoptózu |
| ICAD | inhibitor kaspázy aktivované DNázy |
| IMRT | ozařování modulovaným svazkem |
| IPA | kyselina indol-3-propionová |
| LH | luteinizační hormon |
| LHRH | hormon uvolňující luteinizační hormon |
| PARP | poly(ADP-ribóza)polymeráza |
| PSA | prostatický specifický antigen |
| TNFR | receptor pro tumor necrosis factor |

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek č. 1: Proteiny účastníci se vnitřní, mitochondriální, apoptotické dráhy | 4 |
| Obrázek č. 2: Regulace vnější dráhy prostřednictvím FLIP proteinu..... | 7 |
| Obrázek č. 3: Gleasonův histologický vzor buněk rakoviny prostaty. | 10 |
| Obrázek č. 4: Chemická struktura indolu a testovaných derivátů..... | 15 |
| Obrázek č. 5: Vliv skatolu na vybrané apoptotické markery..... | 28 |

Seznam grafů

| | |
|---|----|
| Graf č. 1: Kinetické měření intenzity fluorescence v buněčné linii 22Rv1. | 25 |
| Graf č. 2: Aktivita kaspázy 3 po působení indolových derivátů. | 26 |
| Graf č. 3: Aktivita kaspázy 3 při 4, 8, 16 a 24h inkubaci s 3-methylindolem..... | 27 |

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Příprava 1,0 mm tlustého 12,5% dělicího gelu pro SDS-PAGE 23

Tabulka č. 2: Příprava 1,0 mm tlustého 4% zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE 23

1. ÚVOD

Rakovina prostaty je druhou nejčastější rakovinou u mužů a zároveň rakovinou s nejvyšší úmrtností. Léčba je prováděna radioterapií, chemoterapií, hormonální léčbou nebo chirurgickým odstraněním karcinomu. Rakovinové buňky prostaty, jejich růst a dělení, jsou ovlivňovány řadou hormonů, a to především testosteronem, který se váže do androgenního receptoru (AR), čímž ovlivňuje buňku. Chemoterapie rakoviny prostaty je často založena na aplikaci látek s anti-androgenní aktivitou, kterými jsou i antagonisté AR. V nedávné studii byl popsán anti-androgenní účinek vybrané skupiny indolových derivátů, kdy jedním z nich byl i fyziologicky přítomný 3-methylindol (skatol). Protože autoři této studie zmínili silný toxický účinek této látky, bylo účelem této práce ověřit, zda tato látka, včetně ostatních anti-androgenně působících indolů, může indukovat apoptózu v rakovinných prostatických buňkách.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo vypracování rešeršní práce na téma bakalářské práce spolu s vypracováním bakalářské práce a multimediální prezentace. Experimentální část byla prováděna za účelem sledování indukce apoptózy v prostatické buněčné linii 22Rv1 po vystavení indolovým derivátům.

3. APOPTÓZA

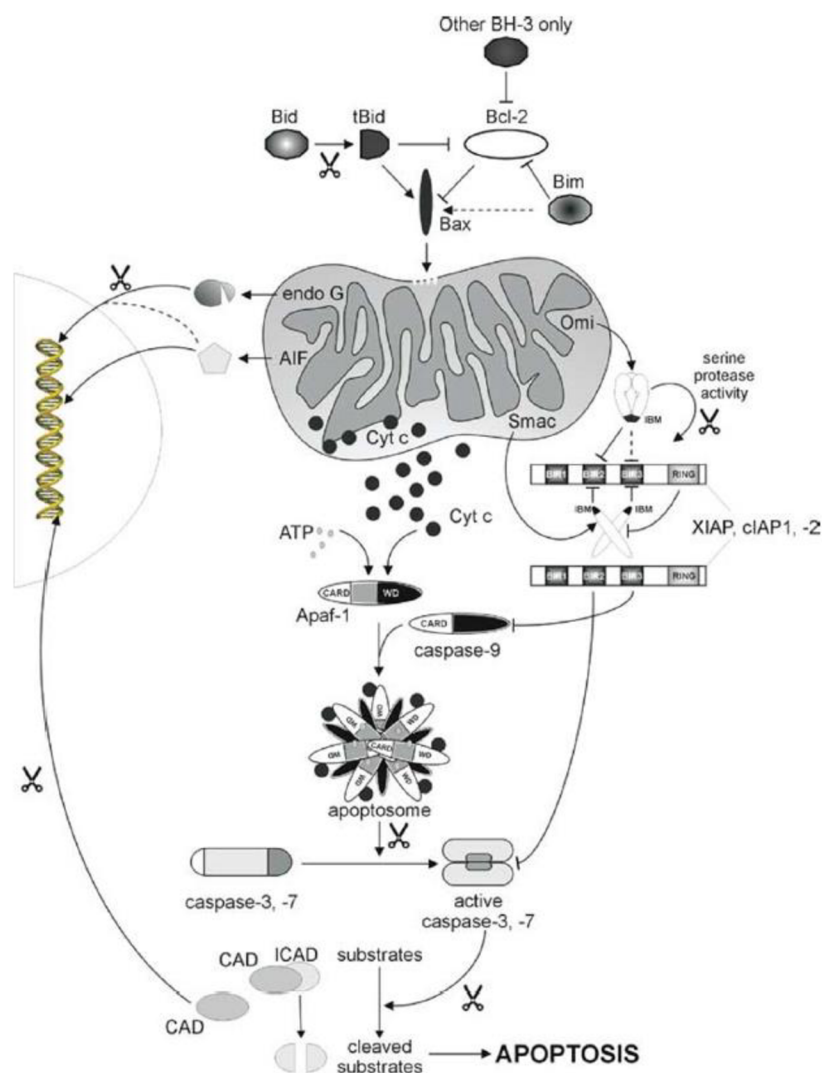
Buňky disponují mechanismy pro kontrolu svého buněčného cyklu, jejich růstu, dělení, regulace, oprav a programované buněčné smrti neboli apoptózy. Apoptóza je konzervovaný přirozený mechanismus sebedestrukce buňky, který slouží k udržení homeostázy mnohobuněčného organismu. Buněčná smrt může být vyvolána spoustou spouštěčů (poškození jaderné DNA, vystavením chemickým látkám, ...) a probíhá buď vnitřní, nebo vnější dráhou.

3.1. Vnitřní a vnější dráha iniciace apoptózy

Apoptóza může být spuštěna dvěma způsoby, a to přes receptory smrti, vnější dráhou, nebo přes mitochondrie, vnitřní dráhou. Obě dráhy zahrnují aktivaci cystein aspartyl-specifických proteáz (kaspáz), které štěpí buněčné substráty a vedou k biochemickým a morfologickým změnám v buňce. Aktivace vnější dráhy je vyvolána skrz receptory smrti, které patří mezi membránové receptory a spadají do rodiny TNF (tumor necrosis factor) receptorů (TNFR). Receptory smrti jsou charakteristické svou vnitrobuněčnou doménou – doménou smrti. Po navázání ligandu na receptor smrti (např. TRAIL-R1 nebo TRAIL-R2) k sobě vnitrobuněčná doména receptoru přitahuje adaptorový protein FADD také známý jako MORT1, který aktivuje neaktivní prokaspázu 8 a 10 (Sprick *et al.*, 2000, Kischkel *et al.*, 2001). Aktivní kaspázy 8 a 10 mají tzv. iniciační funkci, kdy aktivují exekuční kaspázy, nebo mohou pro zvýšení apoptotického signálu aktivovat mitochondriální dráhu prostřednictvím Bid proteinu, který je štěpen kaspázou 8 a přemístěn do mitochondrií (Schug *et al.*, 2011).

Vnitřní dráha, mitochondriální, je zahájena stimulací permeabilizace mitochondriální membrány pomocí Bcl-2 rodiny, jež je rozčleněna do tříd podle homologních aminokyselinových sekvencí, Bcl-2 homologních (BH) domén, a jejich specifických funkcí. Důležitou roli při stimulaci permeabilizace membrány hraje skupina Bcl-2 proteinů, které mají pouze BH3 doménu. Proteiny s pouze BH3 doménou se vážou na Bak a Bax proteiny, čímž vyvolají konformační změny vedoucí k aktivaci Bak a Bax proteinů. Aktivované molekuly Bak a Bax proteinů se svou odhalenou BH3 doménou hydrofobicky vážou do vnější mitochondriální membrány, čímž vyvolají tvorbu pórů (Dewson *et Kluck*, 2009). Jak můžeme vidět na obrázku č. 1, tak jsou z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytosolu buňky uvolněny: cytochrom *c*, AIF (apoptózu indukující faktor), endonukleáza G, Smac/DIABLO, HtrA2/OMI a jiné apoptotické faktory. Proteiny AIF a endonukleáza G jsou přemístěny do jádra, kde štěpí jadernou DNA. Smac/DIABLO a HtrA2/OMI uvolněné z mitochondrií jsou antagonisté inhibitorů apoptotických proteinů (IAP), které se vážou do BIR2 a BIR3 domén proteinů IAP.

Mezi proteiny IAP se řadí XIAP, c-IAP-1 a c-IAP-2, které inhibují apoptotické proteiny. V cytosolu buňky tvoří cytochrom *c* komplex s Apaf-1 (apoptotic protease activating factor- 1), ATP a inaktivní prokaspázou 9, čímž se vytvoří apoptozóm (Obr. 1). Ve vzniklém apoptozómu dochází ke štěpení prokaspázy 9 a vzniká tak aktivní kaspáza 9, která následně štěpí exekuční kaspázy, na obrázku č. 1 zastoupeny kaspázami 3 a 7. Aktivované exekuční kaspázy štěpí buněčné substráty, jako například komplex CAD (caspase-activated DNase) se svým inhibitem, což vyústí v uvolnění aktivní CAD, která štěpí jadernou DNA (Saelens *et al.*, 2004).



Obrázek č. 1: Proteiny účastníci se vnitřní, mitochondriální, apoptotické dráhy. Rodina Bcl-2 proteinů (Bid, Bim, Bax, Bak, ...) reguluje spuštění mitochondriální dráhy apoptózy. Anti-apoptotická skupina Bcl-2 proteinů je zde reprezentována označením Bcl-2. Pro-apoptotické proteiny Bcl-2 rodiny jsou reprezentovány Bid proteinem, který je kaspázou 8 štěpen na tBid. Ten aktivuje Bax protein a stejně jako Bim protein a proteiny s pouze BH3 doménou působí proti anti-apoptotickým Bcl-2 proteinům. Cytochrom *c* (cyt *c*) uvolněný z mitochondrií tvoří spolu s ATP,

apoptotickým aktivačním faktorem 1 (Apaf-1) a kaspázou 9 v cytosolu apoptozóm, který štěpí kaspázy 3 a 7. Aktivované kaspázy 3 a 7 štěpí buněčné substráty. Komplex kaspázou aktivované DNázy s inhibitelem (ICAD) je štěpen kaspázou 3 za uvolnění CAD. Z mitochondrií uvolněná endonukleáza G (endo G) a apoptózu indukující faktor (AIF) jsou stejně jako CAD translokované do jádra, kde štěpí jadernou DNA. Smac/DIABLO (Smac) a HtrA2/OMI (Omi) se váží do domén BIR2 a BIR3 inhibitorů apoptotických proteinů (IAP), a tím neutralizují inhibice kaspázy 9, 7 a 3 způsobené IAP. HtrA2/Omi svou serin proteázovou aktivitou štěpí IAP. Obrázek převzatý z článku (Saelens *et al.*, 2004).

3.2. Spouštěče (genotoxický stres)

Mezi hlavní spouštěče apoptózy se řadí genotoxický stres, který je příčinou poškození jaderné DNA a následného zastavení buněčného cyklu v kontrolních bodech. Na základě rozsahu poškození jaderné DNA dochází buď k reparaci poškození, nebo indukci apoptózy. Nejčastější příčinou poškození DNA jsou exogenní zdroje, především environmentální genotoxiny např. heterocyklické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky, alkylační sloučeniny, ionizující záření nebo UV světlo. DNA je také terčem cytotoxických protirakovinových léčiv. Tato léčiva reagují buď přímo s DNA nebo prostřednictvím reaktivních metabolitů, které chemicky modifikují nukleotidy, anebo nepřímo prostřednictvím začlenění nukleotidových analogů do DNA, případně blokují DNA polymerázy a topoizomerázy (Roos *et Kaina*, 2006).

Mezi významná poškození DNA vedoucí k apoptóze se řadí především O⁶-methylace guaninu, N-alkylace bází, O⁶-chlorethylace bází, DNA adukty, DNA příčné vazby a dvoušroubovicové zlomy (DSB). Pokud dojde k O⁶-methylaci guaninu, která se nestihne opravit, tak to vyústí v zařazení chybné báze, thyminu. Takto vzniklá sekundární léze na DNA vede k blokaci replikace a následnému zlomu dvoušroubovice. Při N-methylaci dochází k N3-methylaci adeninu a N7-methylaci guaninu. Vysoká koncentrace N-methylovaných bází v buňce spouští apoptózu. O⁶-chlorethylace způsobují především příčné vazby v DNA (cross-links), což blokuje replikaci, a tím dochází k DSB. Zlomy dvoušroubovice jsou detekovány pomocí proteinů ATM a ATR, které dále předávají signál CHK1, CHK2 a p53. ATM fosforyluje protein p53, který aktivuje transkripci pro-apoptotických faktorů (FAS, PUMA a Bax) a blokuje proliferaci buňky pomocí upregulace proteinu p21, který zastavuje cyklus v G₁ fázi před přechodem do S fáze (Roos *et Kaina*, 2006).

3.3. Exekutory

Vnitřní i vnější apoptotické dráhy se schází v místě aktivace exekutorů, což je považováno za konečnou dráhu apoptózy, kdy dochází ke štěpení strukturních a opravných

proteinů (PARP, cytokeratiny, ICAD, histon H1, lamin B, jaderný protein NuMA, ...). Mezi efektorové neboli exekuční kaspázy se řadí kaspázy 3, 6 a 7, které jsou v buňkách přítomny v neaktivní formě jako zymogeny, a proto musí být aktivovány některými z iniciačních kaspáz (8, 9 a 10) (Slee *et al.*, 2001).

Kaspáza 3 je považována za klíčovou, v průběhu apoptózy štěpí komplex kaspázou aktivované DNázy (CAD) se svým inhibítozem ICAD. Po rozštěpení komplexu se uvolní aktivní CAD, který se následně přemístí do jádra, kde štěpí jadernou DNA (Enari *et al.*, 1998). Mezi další substráty kaspázy 3 patří protein gelsolin, který po štěpení depolymeruje F-aktin, a tím indukuje reorganizaci cytoskeletu buňky (Kothakota *et al.*, 1997). Kaspázy štěpí i kinázy ROCK-1, které následně fosforylují lehké řetězce myosinu, což vede k tvorbě membránových bublin (Coleman *et al.*, 2001). Výsledkem štěpení cytoskeletálních struktur, jako jsou např. intermediární filamenta cytokeratin-18 a vimentin nebo Gas2 a pektin, je změna tvaru buněk a jejich rozpad na apoptotická tělíska (Byun *et al.*, 2001).

Poslední fází apoptózy je fagocytóza apoptotických tělísek. Spouštěčem pro stimulaci fagocytózy apoptotických tělísek makrofágy je expozice fosfatidylserinu na vnější stranu cytoplazmatické membrány buňky. Fosfatidylserin se za normálních podmínek nachází na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, kde jej udržuje aminofosfolipidová translokáza. V průběhu apoptózy dochází k inhibici tohoto enzymu, což vede k narušení asymetrie fosfolipidové membrány a expozici fosfatidylserinu (Vanags *et al.*, 1996).

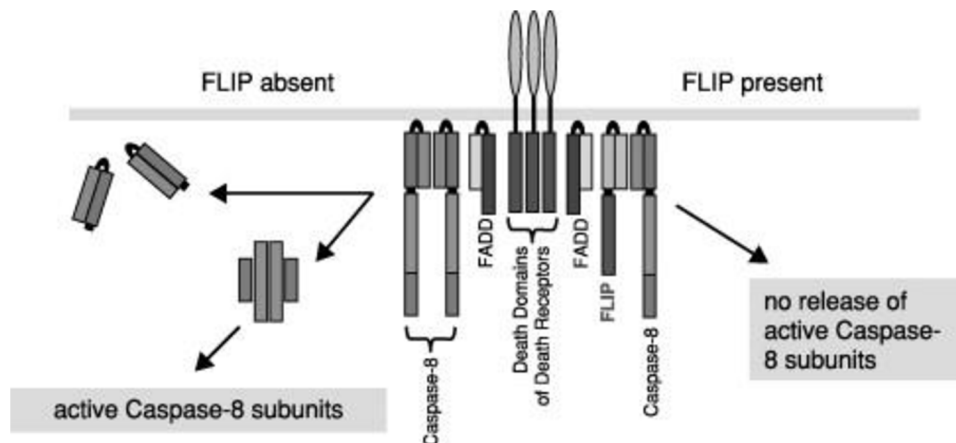
3.4. Regulace

Regulace apoptózy je zajišťována na několika úrovních od samotných oprav poškození DNA k inhibicím aktivace jednotlivých proteinů vnitřní i vnější dráhy a exekutorů. Rodina inhibitorů apoptotických proteinů (IAP) má řadu členů, kteří se od sebe navzájem liší počtem tandemově uspořádaných BIR domén a přítomností RING a CARD domény. Regulace apoptózy se nejvíce účastní proteiny XIAP, c-IAP1 a c-IAP2. Jeden z nejvíce prostudovaných proteinů je XIAP, který má jednu RING doménu a 3 BIR domény, kdy druhá doména (BIR2) se účastní inhibice kaspázy 3 a 7 a třetí doména (BIR3) inhibuje kaspázu 9 (Deveraux *et al.*, 1999). c-IAP1 a c-IAP2 jsou také složeny ze 3 domén BIR a jedné RING domény, která má schopnost ubikvitin ligázové (E3) aktivity (Gyrd-Hansen *et al.*, 2008).

Mezi významné regulátory vnitřní dráhy apoptózy patří rodina Bcl-2 proteinů. Členy Bcl-2 rodiny můžeme rozdělit do dvou skupin na anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 a Bfl-1) a pro-apoptotické (Bax, Bak, Bcl-x_s, Bid, PUMA, Noxa, Bik). Pro Bcl-2 proteiny jsou

charakteristické BH domény, tvořené homologními aminokyselinovými sekvencemi, jejichž prostřednictvím dochází k tvorbě homodimerů a heterodimerů. Proteiny anti-apoptické skupin dokážou tvořit kanály v lipidových membránách. Regulace apoptózy spočívá v poměru členů obou skupin Bcl-2 rodiny. Pokud převažuje pro-apoptická skupina proteinů, tak dojde ke spuštění apoptózy mitochondriální dráhou. Regulace aktivity proteinů Bcl-2 rodiny je zprostředkována především jejich post-translačními modifikacemi a konformačními změnami (Schendel *et al.*, 1997).

Regulace vnější dráhy indukce apoptózy je zprostředkována především proteiny FLIP (FLICE- inhibitorový protein), které se skládají ze dvou DED domén a jedné domény obsahující podobnou sekvenci aminokyselin jako prokaspázy 8 a 10. Doména podobná jednotlivým kaspázám postrádá jejich enzymatickou aktivitu. FLIP protein se pomocí DED váže na FADD, což vyústí v naštípání FLIP místo aktivace kaspáz (Roth *et Reed*, 2004).



Obrázek č. 2: Regulace vnější dráhy prostřednictvím FLIP proteinu. Membránový TNFR s vnitrobuněčnými doménami smrti. Po navázání ligandu k receptoru dojde k asociaci domén smrti s adaptorovými proteiny FADD a prokaspázou 8. Proteiny FADD katalyzují štěpení prokaspázy 8 na aktivní kaspázu 8, která dále buď štěpí Bid protein, který pokračuje vnitřní dráhou, nebo aktivuje exekutory. V případě, že místo prokaspázy 8 je připojen FLIP protein, který je strukturně velmi podobný prokaspáze 8, ale bez její enzymatické aktivity, tak je naštípán FLIP protein, čímž inhibuje vnější a částečně i vnitřní apoptotickou dráhu. Obrázek převzatý z článku (Roth *et Reed*, 2004).

4. RAKOVINA PROSTATY

Prostata neboli předstojná žláza je mužská přídatná pohlavní žláza, která je uložena pod močovým měchýřem, kde obklopuje močovou trubici. Funkcí prostaty je produkce sekretu, který pomáhá formovat ejakulát a udržovat životaschopnost spermií. Plně diferenciovaná prostata je rozdělena na centrální, tranzitní, periferní, uretrální zónu a přední fibromuskulární stroma. U dospělých mužů tvoří periferní zóna až 70 % žlázoové tkáně prostaty, obklopuje ejakulační vývody, vyčnívá pod močovým měchýřem (McNeal, 1981) a zároveň má největší podíl na normální funkci prostaty. Hlavní funkcí stromatu je zajištění vhodného mikroprostředí pro epiteliální kompartmenty. Předstojná žláza je tvořena sítí rozvětvených tubuloalveolárních žlázek, které jsou vystlány jednou vrstvou žláznatých cylindrických buněk s řasinkami na bazální vrstvě složené z jedné vrstvy kubických buněk a neuroendokrinních buněk (Ittmann, 2018).

Rakovina, nekontrolovatelné dělení buněk, obecně vzniká při nahromadění mutací v proto-onkogenech a tumor-supresorových genech, což má za následek narušení funkce proteinů, které za normálních podmínek regulují buněčný cyklus. Rakovina prostaty je nejčastěji diagnostikovanou rakovinou u mužů (1,4 milionů nových případů za rok) a druhou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu (375 000 úmrtí za rok) (Sung *et al.*, 2021). Nejvyšší výskyt rakoviny prostaty je v zemích s vyšší životní úrovní např. západní Evropa, naopak nejnižší výskyt je v jižní Asii. Riziko tvorby nádorů s věkem roste, nejčastěji zasažená věková skupina je od 50 let. Mezi rizikové faktory spadá vyšší věk, rodinná historie, genetické mutace a zdravotní kondice jedince. Vnějšími faktory zvyšující pravděpodobnost propuknutí rakoviny prostaty jsou kouření, nadváha a různé výživové faktory (Sung *et al.*, 2021).

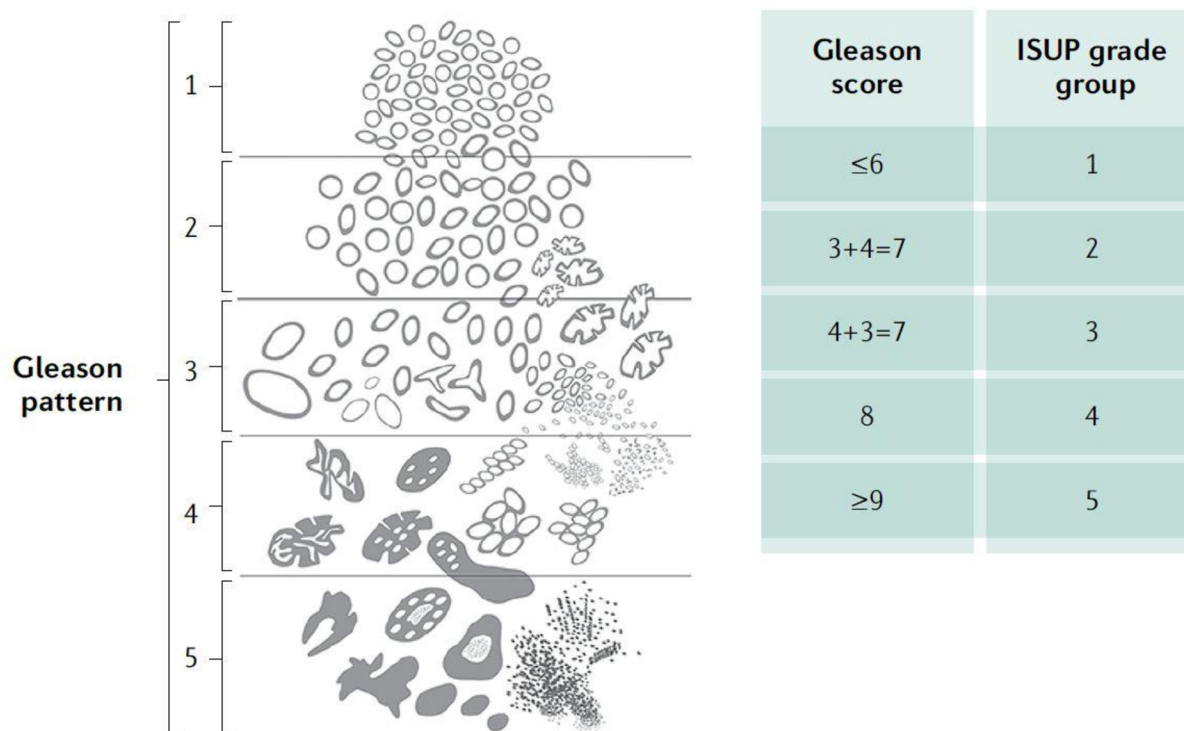
4.1. Diagnostika

Včasná diagnostika a lokalizace rakoviny prostaty je klíčová pro následnou léčbu pacienta a co nejlepší prognózy. V ranných stádiích je rakovina nejlépe léčitelná a pacient má nejvyšší šanci na uzdravení, ale je zároveň asymptomatická. Mezi základní diagnostické metody rakoviny prostaty spadá digitální rektální vyšetření (DRE), krevní testy na stanovení hladiny prostatického specifického antigenu (PSA) a multiparametrická magnetická rezonance (mpMRI). Dále se provádí transrektální ultrazvukové vyšetření prostaty (TRUS) doprovázené biopsií (Schatten, 2018). Digitální rektální vyšetření se provádí pro posouzení zvětšení žlázy, tuhosti a textury, jedná se o preventivní vyšetření, které je většinou doprovázeno krevními testy na určení hladiny PSA (Loeb *et al.*, 2009). Krevní testy na měření hladiny PSA jsou

spolehlivější metodou diagnostiky než DRE a zároveň jsou nezávislé na výsledcích DRE. Hladina PSA může být zvýšena i z jiných příčin, než je rakovina prostaty, např. důsledkem benigní hyperplazie prostaty (BPH). Pro zamezení provádění zbytečných biopsií na základě hladiny PSA musí být pacient opakovaně testován po dobu několika týdnů za standardizovaných podmínek. Měření hladiny PSA zahrnuje stanovení vázaného a volného PSA, jeho hustoty a rychlosti (doby zdvojnásobení) (Pezaro *et al.*, 2014). Multiparametrická magnetická rezonance je jednou ze základních diagnostických metod, která je ve většině případů prováděna na základě výsledků krevních testů před schválením provedení biopsie. V případě, že mpMRI nepotvrdí přítomnost maligních lézí, tak není přistoupeno k biopsii prostaty (Kasivisvanathan *et al.*, 2018).

Biopsie se častěji provádí transrektálně nebo nově transperineálně. Při transrektální (TRUS) biopsii se využívá ultrazvuková sonda pro vizuální kontrolu odběru, jehla pro odběr tkáně vstupuje do těla přes stěnu rekta. TRUS biopsie probíhá při lokální anestezii a odebírá se přibližně 10–12 vzorků tkáně prostaty, které jsou následně podrobeny histologickému vyšetření. Transperineální biopsie probíhá pod celkovou anestezii, kdy jehla pro odběr tkáně vstupuje do těla přes hráz a celý proces se vizuálně kontroluje s pomocí magnetické rezonance. Magnetická rezonance lépe vizualizuje prostatu a její struktury (prokrvení, místa s vyšší a nižší hustotou buněk) oproti ultrazvuku, který jednotlivé struktury nerozeznává a využívá se pro vizualizaci celé žlázy (Eisenstein, 2022).

Vzorky poslané k histologickému vyšetření jsou podrobeny testům pro zjištění přítomnosti rakovinných buněk. V případě pozitivního nálezu se určuje tzv. Gleasonovo skóre (2–10), součet prvních a druhých nejvýraznějších buněk odpovídajících skupin Gleasonova vzoru (Obr. č. 3). Gleasonovo skóre udává agresivitu nádoru na základě diferenciací buněk. Dnes se nejčastěji používá ISUP (International Society of Urological Pathology) modifikace Gleasonovi stupnice, kde je Gleasonovo skóre uspořádané do 5 skupin podle míry rizika šíření nádoru (od 1 – nízké riziko do 5 – nejvyšší riziko) (Egevad *et al.*, 2016).



Obrázek č. 3: Gleasonův histologický vzor buněk rakoviny prostaty. Jednotlivé vzory mají charakteristické rysy: malé uniformní buňky (vzor 1), velké mezibuněčné prostory (vzor 2), zřetelná infiltrace buněk ze žláz na okraji (vzor 3), nepravidelná hmota neoplastických buněk (vzor 4) a malá přítomnost žláz mezi vrstvami buněk (vzor 5). Obrázek převzatý z článku (Rebello *et al.*, 2021).

4.2. Léčba

Léčba rakoviny prostaty je lékařem navržena na základě histologických nálezů, stádia karcinomu a krevních testů, jejímž cílem je především zastavení růstu rakovinového bujení, odstranění ložiska karcinomu a prodloužení života pacienta. Nejčastěji se využívá kombinace léčebných postupů pro zajištění nejefektivnější léčby. Mezi nejčastěji používané léčebné metody patří radioterapie, chemoterapie, hormonální terapie a částečné nebo úplné odstranění prostaty.

Radikální prostatektomie (RAPE) je chirurgický zákrok za účelem odstranění předstojné žlázy a tkáně nejbližšího okolí. Chirurgický zákrok může probíhat různými metodami lišícími se především místem vstupu do těla pacienta a způsobem provedení: retropubicky, perineálně, “konvenčně” laparoskopicky a laparoskopicky asistovaným robotem. Jedná se o jednu z nejhojněji používaných metod léčby rakoviny prostaty u lokalizovaných a ohraničených karcinomů. V případě rozšíření rakoviny do lymfatických uzlin se spolu s RAPE provádí pánevní lymfadenektomie, chirurgické odstranění pánevních lymfatických uzlin (Wang *et al.*, 2017).

Radioterapie využívá ionizující záření (γ -záření, proud protonů) pro poškození a usmrcení rakovinových buněk s co nejmenším poškozením okolní zdravé tkáně. Radioterapie lze rozdělit podle způsobu ozařování na vnitřní (brachyterapie) a vnější. V rámci zevní radioterapie se provádí například radioterapie modulovaným svazkem (IMRT), kdy se více paprsků záření protíná v cílovém místě. Energie jednotlivých paprsků je nastavena tak, aby nejvyšší množství energie bylo vyzářeno v cíleném orgánu, a tím se co nejvíce eliminoval vliv energie paprsků na okolní tkáň. Jednou z dalších metod vnější radioterapie je protonová terapie, která využívá vlastnosti vysokoenergetických protonů generovaných z cyklotronu. Paprsek protonů putuje přes tkáň do stanovené hloubky, kde předá většinu své energie. Brachyterapie využívá možnost zavedení zdroje záření do cílového místa, kde ozařuje okolní buňky (Gay *et Michalski*, 2018).

Hormonální terapie je založena na útlumu růstu a množení rakovinných buněk působením hormonů. Růst buněk prostaty je řízen hladinou testosteronu v krvi, který je produkován ve varlatech a kůře nadledvin na základě hladiny luteinizačního hormonu (LH) z přední hypofýzy. Stimulace přední hypofýzy je zajištěna hormonem uvolňujícím luteinizační hormon (LHRH) z hypotalamu, jehož produkce je ovlivňována hladinou estrogenu v krvi. Karcinom prostaty je léčen na základě snížení hladiny testosteronu na tzv. kastroční hladinu, čehož může být dosaženo chirurgicky (odstranění varlat, orchiektomie) nebo farmakologicky. Pro dosažení farmakologické kastrace jsou využívány LHRH agonisté a antagonisté. Při podávání LHRH agonistů dochází ke konstantní stimulaci přední hypofýzy, což vede k omezení produkce luteinizačního hormonu. Antagonisté LHRH blokují receptory v přední hypofýze, a tím zabraňují produkci LH. Do hormonální terapie patří také blokace androgenních receptorů pomocí anti-androgenů, které zabrání navázání dihydrotestosteronu a testosteronu na androgenní receptor bez ovlivnění jeho hladiny v krvi (Hellerstedt *et Pienta*, 2002).

Chemoterapie spočívá v poškození buněk, zastavení jejich růstu a dělení následkem vystavení cytotoxickým a cytostatickým chemickým látkám. Chemoterapie je nejčastěji aplikována v případě nálezu karcinomu v pokročilém stádiu a při léčbě kastročně rezistentního karcinomu prostaty (CRPC). Nejčastěji používaná chemoterapeutika jsou docetaxel a enzalutamid (Boulos *et Mazhar*, 2017). Docetaxel působí cytotoxicky, váže se na β -tubulin, čímž zabraňuje depolymerizaci mikrotubulů, která vede k zastavení buněčného cyklu a následně k apoptóze (Zhu *et al.*, 2013). Enzalutamid funguje jako inhibitor androgenního receptoru (AR), inhibuje translokaci AR do jádra a jeho navázání na DNA (Millán *et Castañeda*, 2014).

4.3. Významné molekulární mechanismy

Mezi hlavní molekulární mechanismy rakoviny prostaty patří především regulace buněčného cyklu prostřednictvím aktivace androgenního receptoru (AR). AR má v rakovinové buňce funkci transkripčního faktoru. Dokáže také regulovat přechod G₁ fáze buněčného cyklu na S fázi prostřednictvím indukce signálů aktivující cyklin dependentní kinázy (CDK), které ve zdravé buňce řídí průběh buněčného cyklu. Následkem AR zprostředkované indukce signálů, které podporují aktivitu CDK, dochází k fosforylaci (inaktivaci) retinoblastomového proteinu (RB), omezení exprese proteinu p27 a indukci aktivity rodiny transkripčních proteinů regulující buněčný cyklus (E2F). Retinoblastomový protein ve zdravé buňce chrání před rozvojem nádorů pomocí regulace E2F rodiny proteinů, čímž kontroluje produkci proteinů potřebných pro buněčnou replikaci. Do regulace proliferace buněk karcinomu prostaty je zapojená i celá řada genů, jako jsou například geny TP53, PTEN a MYC. TP53 se řadí mezi tumor-supresorové geny a má funkci regulace a strážce genomické integrity v průběhu buněčné proliferace. V případě poškození DNA následkem genotoxického stresu, zastavuje buněčný cyklus v G₁ fázi, dokud není DNA opravena nebo jsou spuštěny apoptotické dráhy. Mutace v genu zapříčiňují ztrátu funkce proteinu p53. PTEN je tumor-supresorový gen, který reguluje přechody mezi fázemi G₁/S a G₂/M. K inaktivaci PTEN genu dochází prostřednictvím delecí nebo mutací. MYC je proto-onkogen, jehož amplifikace a nadměrná exprese doprovází postup rakoviny prostaty (Ben-Salem *et al.*, 2021).

5. INDOLY

Indol je aromatická heterocyklická organická sloučenina složená z šestičlenného benzenového jádra a pětičlenného pyrolového kruhu (Bandini, 2013). Jedná se o nejhojněji zastoupený heterocyklus v přírodních produktech. Indol je biologicky aktivní molekula, jejíž deriváty jsou využívány ve více odvětvích průmyslu (parfémy), ale nejvíce jsou využívány ve farmakologii (Barluenga *et* Valdés, 2011). Indolové alkaloidy byly nalezeny a identifikovány v několika rostlinných čeledích včetně toješťovitých (*Apocynaceae*), mořenovitých (*Rubiaceae*), tupelovitých (*Nyssaceae*) a logániovitých (*Loganiaceae*). Tisíce chemických sloučenin izolovaných z rostlin obsahovaly indolové jádro. U látek obsahující indolová jádra byla prokázána jejich biologická aktivita a farmakologické účinky. V medicíně mají indolové alkaloidy široké využití pro jejich protirakovinové, antivirové, antibakteriální, analgetické, antidepressivní, protizánětlivé účinky a mnoho dalších (Kaushik *et al.*, 2013).

Schopnost syntetizovat indol a jeho deriváty má velká řada rostlin a mikroorganismů. Lidská střevní mikroflóra zajišťuje rozklad přijaté nestravitelné potravy (např. vlákniny), jejíž složky rozkládá na jednodušší vstřebatelné sloučeniny. Ve střevní mikroflóře se nachází mikroorganismy, které syntetizují indolové deriváty z tryptofanu. Tryptofan je esenciální aminokyselina, kterou si tělo nedokáže samo syntetizovat, proto jej musí přijímat v potravě. Tryptofan může být v tlustém střevě metabolizován třemi různými dráhami: kynureninovou, serotoninovou a mikrobiální dráhou. Přibližně 90–95 % tryptofanu je metabolizováno kynureninovou dráhou, 1–2 % serotoninovou dráhou a zbytek mikrobiální dráhou. Mikrobiální dráhou je tryptofan rovnou přeměněn na indol a jeho deriváty např. kyselinu indol-3-propionovou (IPA), kyselinu indol-3-octovou (IAA), 3-methylindol (3MI, skatol) a jiné (Liu *et al.*, 2023).

5.1. Vliv na buněčné úrovni

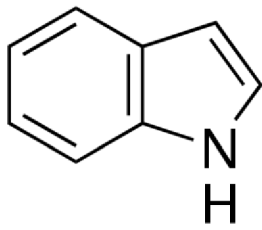
Indol a většina indolových derivátů jsou endogenními ligandy aryl uhlovodíkového receptoru (AhR). AhR je jaderný receptor, který se řadí mezi ligandem aktivované transkripční faktory, kdy po navázání ligandu na AhR je receptor translokován do jádra, kde se naváže na tzv. responzivní elementy na DNA. Vliv indolů a jejich derivátů na AhR je různý, některé sloučeniny působí jako agonisté a některé jako antagonisté AhR. Například bylo prokázáno, že indol-3-karbinol (I3C), který je agonista AhR, inhibuje karcinogenezi v buněčných liniích rakoviny tlustého střeva (HCT-116, HT-29 a DLD1). I3C způsobuje zvýšení exprese tumor-supresorového proteinu p53, který aktivuje apoptotické regulační faktory Bcl-2 rodiny

a kaspázy, což vede k poškození DNA a následné apoptóze buňky (Liu *et al.*, 2023). V nedávné studii bylo potvrzeno, že v buněčné linii HepaRG působí některé monomethylindoly jako agonisté AhR a indukují transkripci genu pro CYP1A (Vyhlídalová *et al.*, 2019). V rámci nedávného výzkumu byl zjištěn vliv methylindolů a methoxyindolů na aktivaci AhR s následným potlačením genové exprese a aktivity AR. Bylo prokázáno, že všechny testované indolové deriváty do jisté míry aktivovali AhR, ale u látek 3-methylindol (3MI), 4MI, 1,3-dimethylindol (1,3-DMI), 2,5-DMI, 2,3,7-trimethylindol (2,3,7-TMI), 4,6-dimethoxyindol (4,6-DMI), 5,6-dimethoxyindol (5,6-DMI) a 7-methoxy-4-methylindol (7-MeO4MI) byla prokázána schopnost potlačit dihydrotestosteronovou (DHT) aktivaci AR. Tyto látky tak vykazovaly anti-androgenní účinek. Navíc 3MI a 4MI vyvolaly pokles proliferace měřený pomocí metody krystalové violeti (Zgarbová *et Vrzal*, 2023).

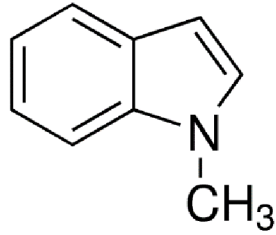
5.2. Testované indolové látky

Mezi testované látky (Obr. 3) byly zařazeny monomethylindoly, 7-methoxy-4-methylindol, 1,3-dimethylindol (1,3-DMI), 2,3-dimethylindol (2,3-DMI), 4,6-dimethoxyindol (4,6-DMI), 5,6-dimethoxyindol (5,6-DMI) a 2,3,7-trimethylindol (2,3,7-TMI). Všechny testované látky jsou AhR agonisté a potlačují DHT indukovanou a AR zprostředkovanou genovou expresí (Zgarbová *et Vrzal*, 2023).

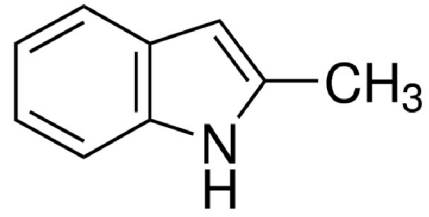
Z testovaných monomethylindolů je asi nevýznamnější skatol (3-methylindol, 3MI) (Obr. č. 4). 3MI je výsledkem degradace tryptofanu bakteriemi střevní mikroflóry. Skatol se nachází také v kouři z cigaret, kde vzniká spalováním tabáku. 3MI je známý pro své pneumotoxické účinky zprostředkované katalytickou aktivitou určitých enzymů cytochromu P450, kterými je metabolizován. Vzniklé meziproducty degradace jsou vysoce reaktivní a mají za následek alkylaci jaderné DNA a následně její zlomení, což vede ke spuštění apoptotických drah (Nichols *et al.*, 2002). Skatol má široké využití zejména v medicíně pro syntézu celé řady léčiv jako jsou například: antibiotika, analgetika, antidiuretika, protirakovinné léky, léky na vysoký tlak a spousty dalších. Dále se využívá také v zemědělství pro syntézu rostlinných růstových regulátorů, insekticidů a herbicidů. Přesto, že 3MI má velmi výrazné aroma po fekáliích, tak se ve velmi naředěné formě využívá při výrobě esenciálních olejů (Fu *et al.*, 2022).



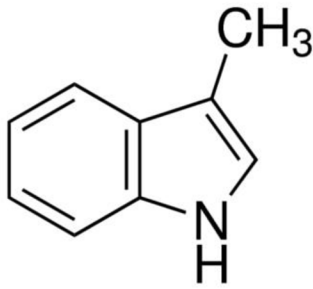
indol



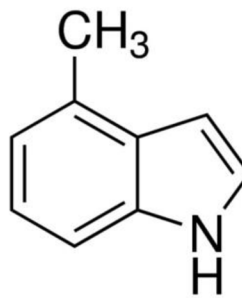
1-methylindol



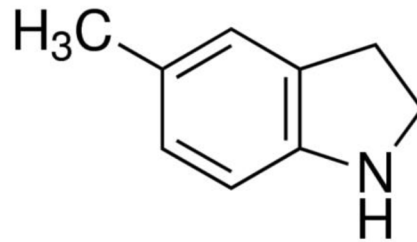
2-methylindol



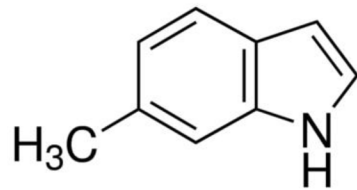
3-methylindol



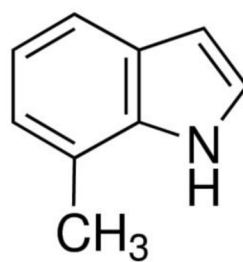
4-methylindol



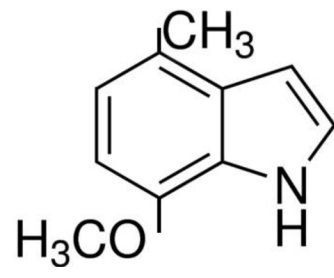
5-methylindol



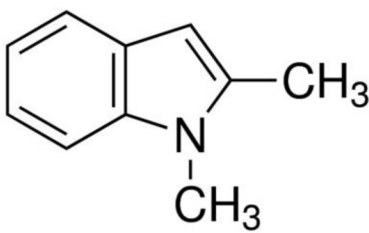
6-methylindol



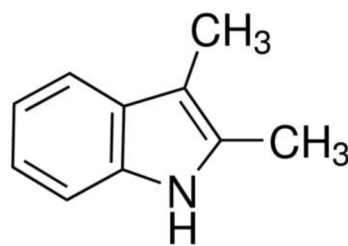
7-methylindol



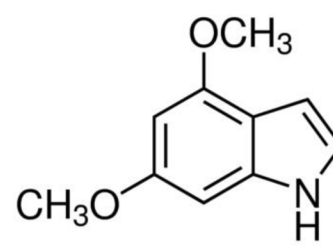
7-methoxy-4-methylindol



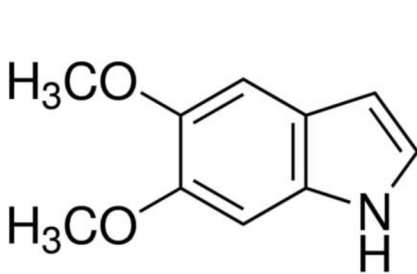
1,2-dimethylindol



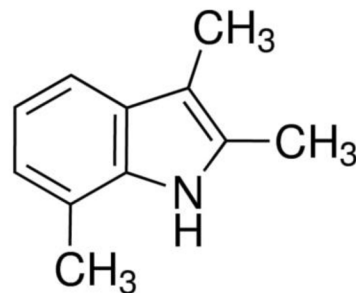
2,3-dimethylindol



4,6-dimethoxyindol



5,6-dimethoxyindol



2,3,7-trimethylindol

Obrázek č. 4: Chemická struktura indolu a testovaných derivátů. Obrázek převzatý ze stránky sigmaaldrich.com.

6. MATERIÁL A METODY

6.1. Biologický materiál

Pro experimentální účely byla použita adherentní buněčná linie 22Rv1 (ECACC 05092802) odvozena z buněk lidského karcinomu prostaty.

6.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, T4049)
- 10x koncentrovaný roztok Tris/Glycin Buffer (Bio-rad, 1610771)
- 10x koncentrovaný roztok Tris/Glycin/SDS Buffer (Bio-rad, 1610732)
- 20x koncentrovaný roztok TBS (Thermo scientific, 28358)
- 40% roztok akrylamid/Bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, A2792)
- Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, A2153)
- Bradfordovo činidlo (Serva, 39222.03)
- Deionizovaná voda (ddH₂O)
- Dimethylsulfoxid (Lach-Ner, 67-68-5)
- Dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, L3771)
- Doxorubicin (Abcam, ab234039)
- Dulbecco's PBS (Serana, BDL-001)
- Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, F7524)
- Indolové deriváty:
 - 1-methylindol (Sigma-Aldrich, 193984)
 - 2-methylindol (Sigma-Aldrich, M51407)
 - 3-methylindol (Sigma-Aldrich, M51458)
 - 4-methylindol (Energy Chemical, E020483)
 - 5-methylindol (Sigma-Aldrich, 222410)
 - 6-methylindol (Sigma-Aldrich, 246328)
 - 7-methylindol (Sigma-Aldrich, M51490)
 - 7-methoxy-4-methylindol (1ClickChemistry Inc, 1C72757)
 - 5,6-dimethoxyindol (Sigma-Aldrich, 246255)
 - 4,6-dimethoxyindol (Sigma-Aldrich, 75066-1G-F)
 - 1,3-dimethylindol (Shenghai SINKH Pharmaceuticals Tech. Co., 875-30-9)

- 2,3-dimethylindol (Sigma-Aldrich, 120812)
- 2,3,7-trimethylindol (Sigma-Aldrich, CDS014194)
- Isopropylalkohol (Lach-Ner, 67-63-0)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, F6178)
- Lyzační pufr (pH 7.5; 50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 with anti-protease and anti-phosphatase cocktail)
- Methanol (Penta, 67-56-1)
- Neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich, M7145)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED) (MilliporeSigma, 1.10732.0100)
- Persíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, A3678)
- Ponceau S. Rouge (Biotium, 22001)
- Primární protilátky:
 - Primární protilátka β -aktin, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, sc- 47778)
 - Primární protilátka capase-3, rabbit polyclonal (Cell Signaling Technology, 9662S)
 - Primární protilátka p53, mouse monoclonal (Cell Signaling Technology, 48818S)
 - Primární protilátka PARP, rabbit polyclonal (Cell Signaling Technology, 9542S)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, 1610374)
- Re-Blot Plus Strong Solution (MilliporeSigma, 2504)
- RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, R0883)
- Runing gel Buffer pH 8,8 (Bio-rad, 161-0798)
- Sekundární protilátky:
 - Sekundární protilátka anti-mouse IgG (Cell Singaling Technology, 7076S)
 - Sekundární protilátka anti-rabbit IgG (Cell Singaling Technology, 7074P2)
- Stacking gel Buffer pH 6,8 (Bio-rad, 161-0799)
- Sušené mléko 1,3% tuku (Laktino)
- Trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)
- WesternSure Pen (LI-COR, 926-91000)
- WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate (LI-COR, 926-95000)

Použité soupravy

- Caspase 3 Assay Kit, Fluorimetric (Sigma-Aldrich, kat. č. CASP3F-1KT)

Použité roztoky

- Migrační pufr (100 ml 10x Tris/Glycin/SDS Buffer + 900 ml dd H₂O)
- TBS/Tween (50 ml 20x TBS + 950 ml ddH₂O + 500 µl Tween)
- Transferový pufr (100 ml 10x Tris/Glycin Buffer + 200 ml metanol + 700 ml ddH₂O)

6.3. Seznam použitých přístrojů

- Analytické váhy ABS-80-4N (Kern)
- Blotovací aparatura Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad)
- C-DiGit Blot Scanner (LI-COR)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf)
- Elektroforetická cela Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- Hlubokomrazící box MDF U53V (Sanyo)
- Chladnička (Geronje)
- Inkubátor NB-203XL (N-BIOTEK)
- Kývačka MR-12 (Biosan)
- Laminární box Labculture ® (ESCO)
- Mikroskop (Novel Optics)
- Minikývačka MR-1 (Biosan)
- Sonikační lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (Bandelin)
- Spektrofotometr infinite 200Pro (Tecan i-control)
- Stroj na výrobu ledu F100 Compact (Icematic)
- Termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02-n (Major Science)
- Vodní lázeň LCB22D (LabTech)
- Vortex Reax Top (Heidolph)
- Zdroj napětí Enduro 300V (Labnet)

6.4. Použitý software

- i-control 1.11.1.0 (Tecan)
- Image Studio Digits Version 3.1.4 (Li-COR)
- Microsoft Excel (Microsoft)

6.5. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

V rámci praktické části bakalářské práce byl sledován vliv vybraných indolových derivátů na buňky rakoviny prostaty 22Rv1. Vyvolané genotoxické poškození a indukce apoptózy bylo vyhodnocováno pomocí metody western blot a fluorimetricky zjištěné aktivity kaspázy 3 (Caspase 3 Assay Kit, Fluorimetric).

6.5.1. Příprava kultivačního média

Studovaná buněčná linie byla uchovávána v kultivační lahvi v živném médiu v inkubátoru, který zajišťoval stálé podmínky 5% CO₂, 37 °C a 95% vlhkost. Pro zajištění optimálního růstu a dělení buněk byl do komerčně dostupného média RPMI-1640 přidán roztok fetálního bovinního séra, L-glutaminu a neesenciálních aminokyselin. Ve sterilním prostředí laminárního boxu bylo otevřeno RPMI-1640 médium, do kterého bylo přidáno 50 ml fetálního bovinního séra, 5 ml L-glutaminu a 5 ml neesenciálních aminokyselin. Takto připravené médium bylo promícháno a uchovávané v chladničce při 4 °C.

6.5.2. Pasážování, počítání a vysetí buněk

Aby nedošlo k přemnožení buněk v kultivační lahvi, bylo pasážování buněk prováděno pravidelně každý 3–4 den ve sterilním prostředí laminárního boxu. Nejdříve bylo RPMI-1640 médium a PBS vloženo do vodní lázně, kde se nechalo ohřát na 37°C, zatímco trypsin se nechal samovolně rozmrazit na pracovním stole. Kultivační láhev byla vytažena z inkubátoru a přenesena pod mikroskop, kde byly buňky vizuálně zkontrolovány a následně vloženy do laminárního boxu. Ohřáté médium, PBS a trypsin byly očištěny a vloženy do laminárního boxu. Z kultivační lahve bylo pomocí odsávačky odsáto staré kultivační médium. Buňky byly opláchnuty 5 ml PBS, které bylo následně odsáto. Do kultivační lahve byl přidán 1 ml 0,25% trypsinu. Lahev byla uzavřena a přenesena do inkubátoru, kde se nechal trypsin působit na buňky po dobu 5 minut. Působením trypsinu byly rozrušeny kontakty přisedlých buněk se dnem kultivační lahve. Po uplynutí 5 minut byla kultivační lahev vytažena z inkubátoru, vizuálně bylo ověřeno uvolnění buněk ze dna lahve a lahev byla vložena do laminárního boxu, kde do ní bylo přidáno 9 ml nového kultivačního média. Pomocí opakovaného nasávání a vypouštění suspenze pipetou proti stěně kultivační lahve byly rozsuspendovány vzniklé shluky buněk. Suspenze buněk byla přenesena do 15ml zkumavky. 2 ml suspenze byly vráceny zpět do kultivační lahve, kde bylo přidáno 18 ml nového kultivačního média a lahev byla následně přenesena zpět do inkubátoru (5% CO₂, 37 °C, 95% vlhkost), kde byla ponechána do dalšího

pasážování. Do 0,5ml plastové mikrozkušavky bylo přeneseno 10 μ l suspenze buněk z 15ml zkumavky pro počítání buněk. K suspenzi v 0,5ml mikrozkušavce bylo přidáno 90 μ l roztoku trypanové modři, propipetováno a 10 μ l směsi bylo přeneseno na Bürkerovu komůrku, překryto krycím sklem a pozorováno pod světelným mikroskopem. Bürkerova komůrka je tvořena 9 počítacími čtverci ohraničenými třemi liniemi. Pod mikroskopem byl spočítán počet živých buněk v devíti čtvercích. Pro výpočet koncentrace buněk v suspenzi přenesené do 15ml zkumavky byl použit vzorec $X = (a \cdot 10000 \cdot y) / n$, kde „a“ představuje počet živých buněk v 9 čtvercích, „y“ odpovídá faktoru ředění suspenze buněk trypanovou modří a „n“ je počet počítaných čtverců. Pro měření aktivity kaspázy pomocí Caspase 3 Assay Kit je potřeba 30000 buněk v 200 μ l na jednu jamku 96jamkové destičky a pro metodu Western blot je potřeba 1,5–2 miliony buněk ve 2 ml na jednu jamku 6jamkové destičky. Byl spočítán počet vysévaných jamek pro následný experiment, a z toho byl vypočítán počet buněk potřebných na vyšetí a celkový objem výsledné suspenze. Výchozí suspenze buněk nacházející se v 15ml zkumavce byla v nové 50ml zkumavce naředěna novým kultivačním médiem na potřebnou koncentraci buněk o požadovaném objemu. Do jednotlivých jamek 96jamkové destičky bylo přeneseno 200 μ l namíchané suspenze z 50ml zkumavky. Vyšetá destička byla popsána a vložena do inkubátoru (5% CO₂, 37 °C, 95% vlhkost) na 24 hodin. Lahve s PBS a RPMI-1640 médiem byly sterilně uzavřeny a vráceny do chladničky.

6.5.3. Inkubace s testovanými látkami

Po uběhnutých 24 h od vyšetí buněk na destičky byly k buňkám přidány jednotlivé chemikálie. Inkubace byla prováděna sterilně v laminárním boxu. Nejprve bylo RPMI-1640 médium vloženo do vodní lázně, aby se ohřálo na teplotu 37 °C a zároveň byly vytaženy zásobní roztoky testovaných chemikálií z mrazničky, které se nechaly na pracovním stole rozmrazit. Byly použity zásobní roztoky látek (1-methylindol, 2-methylindol, 3-methylindol, 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol, 7-methylindol, 5,6-dimethoxyindol, 4,6-dimethoxyindol, 1,3-dimethylindol, 2,3-dimethylindol, 2,3,7-trimethylindol a 7-methoxy-4-methylindol) o koncentracích 100 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 3-methylindol o koncentracích 1 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a 50 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, doxorubicin o koncentraci 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Po rozmražení zásobních roztoků byly chemikálie promíchány pomocí vortexu a spolu s ohřátým médiem byly očištěny a vloženy do laminárního boxu. Ve sterilním prostředí laminárního boxu byly do nových mikrozkušavek připraveny pracovní roztoky testovaných látek naředěním zásobního roztoku 1000x pomocí RPMI-1640 média do potřebného objemu. Jednotlivé kultivační destičky s buňkami byly vytaženy z inkubátoru, vizuálně zkontrolovány pod

mikroskopem a následně přeneseny do laminárního boxu, kde bylo pomocí odsávačky z buněk odsáto staré médium. Do každé jamky 96jamkové destičky s buňkami bylo přidáno 200 μ l nového média s rozpuštěnou testovanou látkou o příslušné koncentraci, každá látka o dané koncentraci byla nanášena v kvadruplikátu. Při použití 6jamkové destičky byly nanášeny 2 ml nového média s látkou na jamku a každá látka o příslušné koncentraci byla nanášena v jednom opakování. Jako negativní kontrolu (UT) bylo použito DMSO 1000x zředěno RPMI-1640 médiem a jako pozitivní kontrolu byl použit doxorubicin. Kultivační desky byly řádně popsány a vloženy do inkubátoru (5% CO₂, 37 °C, 95% vlhkost), kde byly inkubovány po dobu 4, 8, 16 a 24 h.

6.5.4. Caspase 3 Assay

Po uplynutí doby inkubace byly destičky vytaženy z inkubátoru a médium s látkami bylo z jamek vyklepnuto do výlevky. Do každé jamky s buňkami bylo přidáno 25 μ l 1x lyzačního pufru připraveného naředěním zásobního roztoku 5x lyzačního pufru vodou v poměru 1:4. Kultivační destičky s lyzačním pufrem byly vloženy do mrazáku na -80 °C na dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byly destičky z mrazáku vytaženy a ponechány na kývačce při pokojové teplotě, aby došlo k rozmražení lyzátu. Během rozmrazování byla připravena reakční směs 10x Assay pufr, který byl naředěn vodou v poměru 1:10. Do 3 ml připraveného 1x Assay pufru bylo přidáno 5 μ l substrátu Ac-DEVD-AMC, který byl připraven rozpuštěním lyofilizovaného prášku v 370 μ l DMSO. Do každé jamky s buňkami a lyzačním pufrem bylo přidáno 200 μ l reakční směsi. Celá směs v jamce byla propipetována a 200 μ l směsi bylo přeneseno do černé destičky. Do černé destičky bylo do 4 jamek přidáno po 200 μ l reakční směsi, do 2 jamek bylo napipetováno po 200 μ l pozitivní kontroly a do 2 jamek bylo přidáno po 200 μ l negativní kontroly. Pozitivní kontrola byla připravena rozpuštěním lyofilizovaného prášku „Caspase 3“ v 50 μ l vody, z takto připraveného zásobního roztoku byl připraven roztok pozitivní kontroly naředěním 200x zásobního roztoku připravenou reakční směsí. Negativní kontrola byla připravena rozpuštěním lyofilizovaného prášku v 500 μ l DMSO, takto vzniklý zásobní roztok inhibitoru Ac-DEVD-CHO byl naředěn reakční směsí v poměru 1:9. Po přepipetování všech roztoků na černou destičku byla destička přikryta, aby nedošlo k vysvěcování fluoroforu a ponechána v klidu na stole 1 hodinu při pokojové teplotě. Po uplynutí doby byla pomocí spektrofotometru změřena fluorescence jednotlivých jamek při nastavení excitace na 360 nm a emise na 460 nm.

6.5.5. Izolace proteinů a stanovení koncentrace

Po uběhnuté době expozice byly 6jamkové destičky vytaženy z inkubátoru a médium s látkami bylo vyklepnuto do výlevky. Každá jamka byla opláchnuta 1 ml vychlazeného PBS. Po opláchnutí jamek byly buňky pomocí stěrky uvolněny ze dna jamky do 1 ml vychlazeného PBS. Směs buněk v PBS byla přenesena do nových 1,5ml plastových mikrozkuvek a dána na led. Jednotlivé vzorky v mikrozkuvkách byly zcentrifugovány (4000 rpm, 4 °C, 5 min). Po odstředění byl z mikrozkuvky odsán supernatant a k peletu bylo přidáno 100 μ l lyzačního pufru, kdy jednotlivé shluky byly rozpuštěny propipetováním. Všechny mikrozkuvky byly promíchány na vortexu, následně byly 5–10 sekund sonifikovány a poté opět vortexovány. Mikrozkuvky byly opět vloženy do centrifugy a odstředěny (13000 rpm, 4 °C, 15 min). Po centrifugaci byl vzniklý supernatant přenesen do nové 1,5ml mikrozkuvky. Takto vzniklé zásobní roztoky jednotlivých vzorků byly uchovávány při -80 °C.

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno Bradfordovou metodou. Ze zásobních roztoků vzorků bylo odebráno po 5 μ l roztoku a přeneseno do nových 0,5ml mikrozkuvek, kde byly vzorky 5x naředěny vodou a následně promíchány na vortexu. Do 96jamkové destičky bylo napipetováno po 10 μ l naředěných vzorků a kalibrační řady v duplikátu. Na destičku byla přidána kalibrační řada o známé koncentraci proteinů pro následné sestavení kalibrační křivky. Deionizovaná voda byla použita jako roztok s koncentrací proteinů rovnou nule, dále byly použity roztoky BSA o koncentracích 0,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l Bradfordova činidla. Pomocí spektrofotometru byla změřena absorbance při 586 nm.

6.5.6. SDS-PAGE

Ze zásobních roztoků jednotlivých vzorků byly do nových 0,5ml mikrozkuvek připraveny roztoky jednotlivých vzorků s vodou a s LB puftrem tak, aby výsledný obsah proteinů v každé zkumavce byl 30 μ g a výsledný objem byl 20 μ l. Namíchané roztoky vzorků byly promíchány na vortexu a následně vloženy do termobloku s nastavenou teplotou na 95 °C, kde byly denaturovány po dobu 5 minut. Po proběhnuté denuraci byly mikrozkuvky se vzorky vloženy na led, následně lehce stočeny a vráceny na led, kde zůstaly, než byla připravena aparatura na elektroforézu.

Podložní (1,0mm) a krycí skla pro přípravu gelů byla očištěna ethanolem a upevněna do stojanu. Podle tabulky č. 1 byl připraven 12,5% dělicí gel do 50ml zkumavky. Chemikálie APS a TEMED byly přidány těsně před nalitím směsi mezi skla. Po nalití dělicího gelu mezi skla

byl gel převrstven isopropanolem a nechal se polymerovat po dobu 20 minut. Po ztuhnutí dělicího gelu byl isopropanol vylit do výlevky a skla byla promyta deionizovanou vodou. Podle tabulky č. 2 byl do 15ml zkumavky připraven roztok na 4% zaostřovací gel. APS a TEMED byly přidány jako poslední před nalitím mezi skla. Po nalití směsi mezi skla byl do gelu vložen 10jamkový 1,0 mm tlustý hřebínek a gel se ponechal přibližně 30 minut polymerovat.

Tabulka č. 1: Příprava 1,0 mm tlustého 12,5% dělicího gelu pro SDS-PAGE

| Reagencie | Objem |
|-------------------------------|--------|
| 40% AA | 2,5 ml |
| ddH ₂ O | 3,4 ml |
| 4x Running gel buffer, pH 8,8 | 2 ml |
| 10% SDS | 80 µl |
| APS | 80 µl |
| TEMED | 8 µl |

Tabulka č. 2: Příprava 1,0 mm tlustého 4% zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE

| Reagencie | Objem |
|--------------------------------|---------|
| 40% AA | 0,3 ml |
| ddH ₂ O | 1,92 ml |
| 4x Stacking gel buffer, pH 6,8 | 0,75 ml |
| 10% SDS | 30 µl |
| APS | 22,5 µl |
| TEMED | 3 µl |

Skla se ztuhlými gely byla vytažena ze stojanu a umístěna do elektroforetické komůrky. Do prostoru mezi skly s gely a do elektroforetické komůrky byl nalit migrační pufr. Z gelů byly vyjmuty hřebínky a do jednotlivých jamek byly napipetovány připravené vzorky denaturovaných proteinů a 2 µl standardu molekulových hmotností. Elektroforetická komůrka byla zavřena a zapojena ke zdroji napětí, kde byl nastaven konstantní elektrický proud na 20 mA na jeden gel. Elektroforéza probíhala zhruba 1 hodinu.

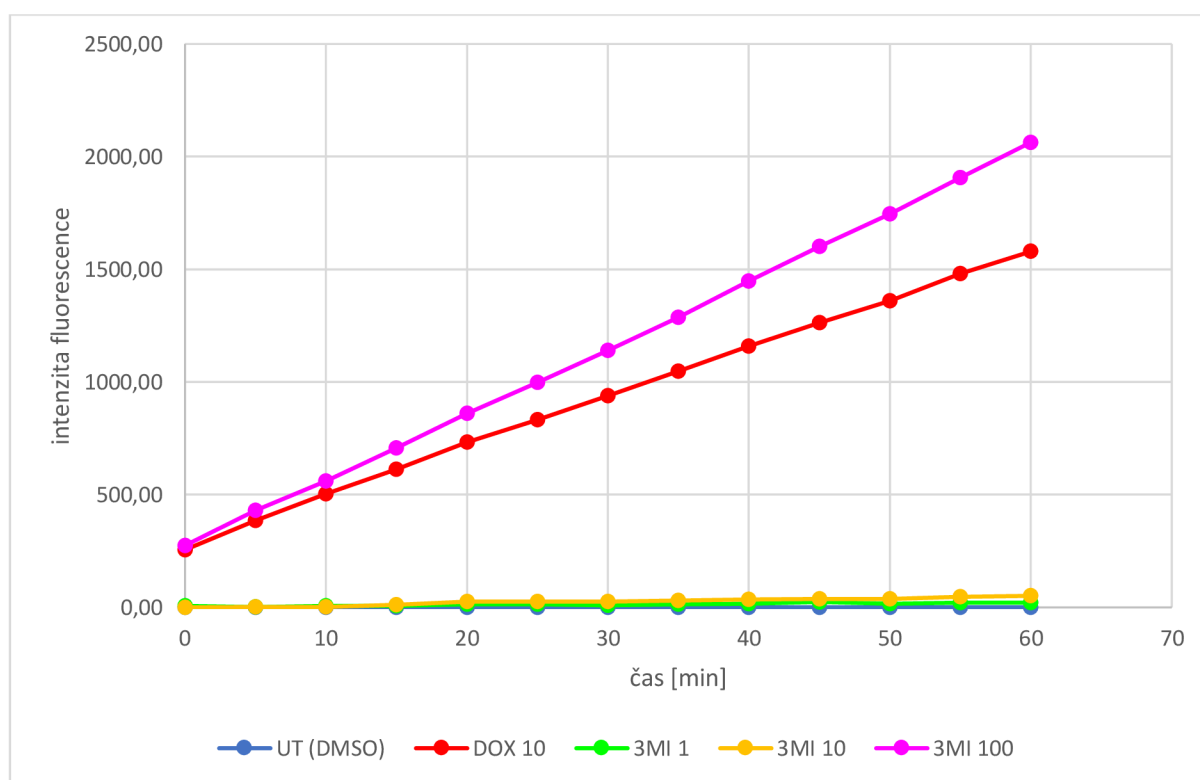
6.5.7. Western blotting

Před ukončením elektroforézy byla PVDF membrána hydratována 1 minutu v methanolu, následně promyta deionizovanou vodou 2x po dobu 10 minut a vložena do transferového pufru. Po dokončení elektroforézy byla vytažena skla s gely a vložena do transferového gelu, kde byla skla od sebe oddělena, zaostřovací gel byl vyhozen a dělicí gel byl vložen do transferového pufru. Na anodu semi-dry blotovací aparatury byly umístěny na sebe: 2x filtrační papír namočený v transferovém pufru, membrána, gel, 2x filtrační papír namočený v transferovém pufru. Jednotlivé vrstvy byly uhlazeny válečkem. Vše bylo přiklopeno víkem a zapojeno do zdroje napětí, kde byl nastaven konstantní proud 350 mA a maximální dovolené napětí 23V. Po uběhnutí 1 hodiny byl zdroj vypnut a kazeta byla rozebrána. Gel byl vyhozen a membrána byla hydratována v methanolu a následně promyta 2x 5 minut deionizovanou vodou. Membrána byla obarvena pomocí Ponceau S, promyta deionizovanou vodou a vysušena. Podle potřeby byla membrána popsána, ořezána a opět hydratována methanolem a deionizovanou vodou. Membrána byla vložena na 1 hodinu do roztoku 5% BSA v TBS/Tween pro vyblokování nespecifické vazby protilátek. Po blokaci byla membrána inkubována přes noc v lednici na kývačce v roztoku 5% BSA s primárními protilátkami naředěnými v poměru 1:750 u kaspázy 3, 1:1000 u PARP a p53 a 1:2000 u β -aktinu (β -aktin se inkubuje 1 hodinu). Po uběhnutí inkubace byly membrány promyty 3x 5 minut TBS/Tweenem a na 1 hodinu byly inkubovány v 5% mléku v TBS/Tween se sekundárními protilátkami naředěnými v poměru 1:2000 u myši (p53, β -aktin) a 1:5000 u králičí protilátky (kaspáza 3, PARP). Po inkubaci se sekundárními protilátkami byly membrány opět promyty 3x 5 minut v TBS/Tweenu. Následně byly vytaženy na podložní sklo, kde byl na ně nakapaný chemiluminiscenční substrát. Po 5 minutách působení substrátu byla membrána přenesena na ethanolem umytý skener, kde byla zatížena podložním sklem a byla provedena detekce. Po dokončení detekce byl skener umyt ethanolem a membrána byla buď vyhozena, nebo stripována v případě opětovné detekce proteinů na dané membráně. Během stripování byla membrána 15 minut inkubována v „re-blot“ roztoku, který byl připraven 10x zředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou. Po inkubaci byla membrána promyta 2x 5 minut v roztoku 5% BSA v TBS/Tween. Následovala inkubace membrány s další primární protilátkou dle potřeby podle stejného postupu popsaného výše.

7. VÝSLEDKY

7.1. Aktivita kaspázy

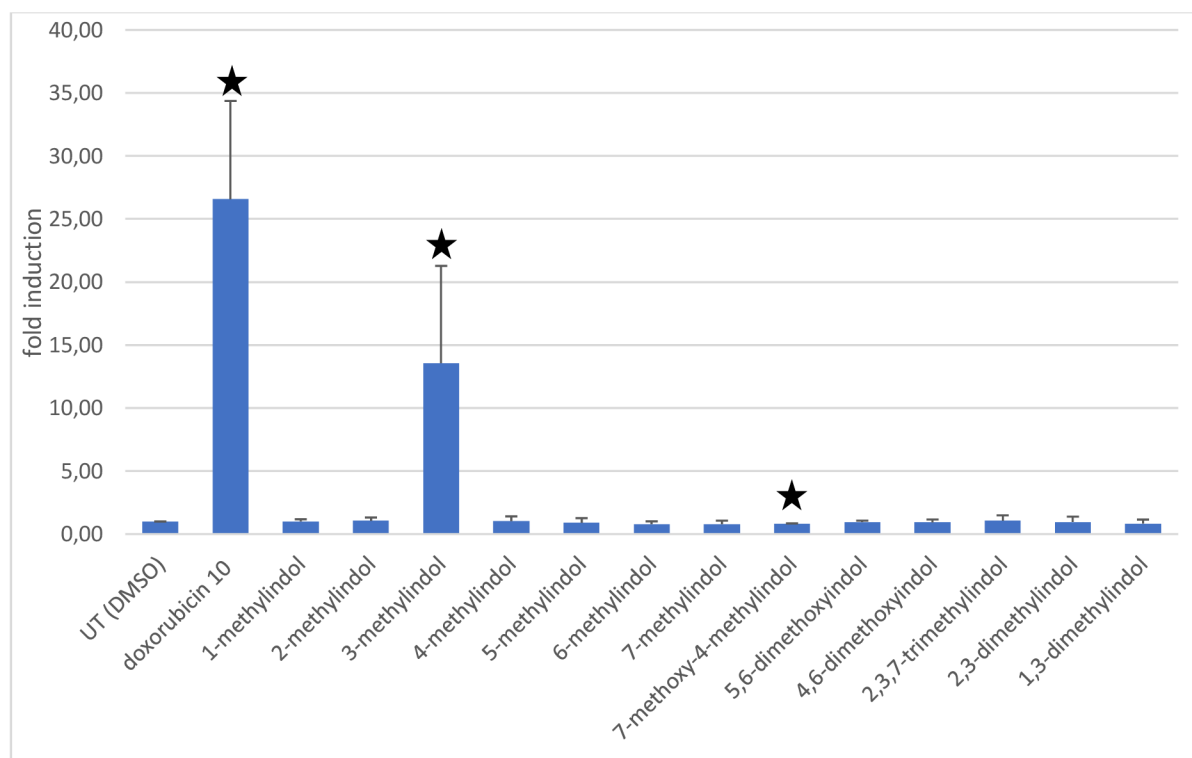
Pomocí Caspase 3 Assay soupravy byla měřena aktivita kaspázy 3 v buňkách buněčné linie 22Rv1 po působení testovaných látek. Jako první byl pomocí kinetického měření sledován nárůst aktivity kaspázy 3 v závislosti na čase, abych našla vhodnou dobu inkubace se substrátem. Buňky byly vystaveny DMSO, jako negativní kontrole, doxorubicinu $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, jako pozitivní kontrole a 3-methylindolu v koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 24 hodin. Kinetické měření bylo provedeno po dobu 1 hodiny v 5minutových rozestupech.



Graf č. 1: Kinetické měření intenzity fluorescence v buněčné linii 22Rv1. Buňky byly inkubovány po dobu 24 h s 3-methylindolem (3MI) o koncentracích 1, 10, 50 a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO a pozitivní kontrola byla doxorubicin (DOX, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Reprezentativní výsledek kinetického měření ze 3 provedených experimentů.

Z výsledků byl vypořádáno, že po 1 hodině dosáhla aktivita kaspázy 3 nejvyšší hodnoty, a proto byla pro následující pokusy destička inkubována 1 h při pokojové teplotě před samotným měřením.

Následně byl testován vliv jednak pozice methylové skupiny v molekule indolu a zároveň bylo ověřováno, zda indolové deriváty vykazující antagonistické chování vůči AR, mohou indukovat aktivitu kaspázy 3. Buněčná linie 22Rv1 byla po dobu 24 h vystavena látkám 1-methylindol, 2-methylindol, 3-methylindol, 4-methylindol, 5-methylindol, 6-methylindol, 7-methylindol, 5,6-dimethoxyindol, 4,6-dimethoxyindol, 1,3-dimethylindol, 2,3-dimethylindol, 2,3,7-trimethylindol a 7-methoxy-4-methylindol o koncentracích $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

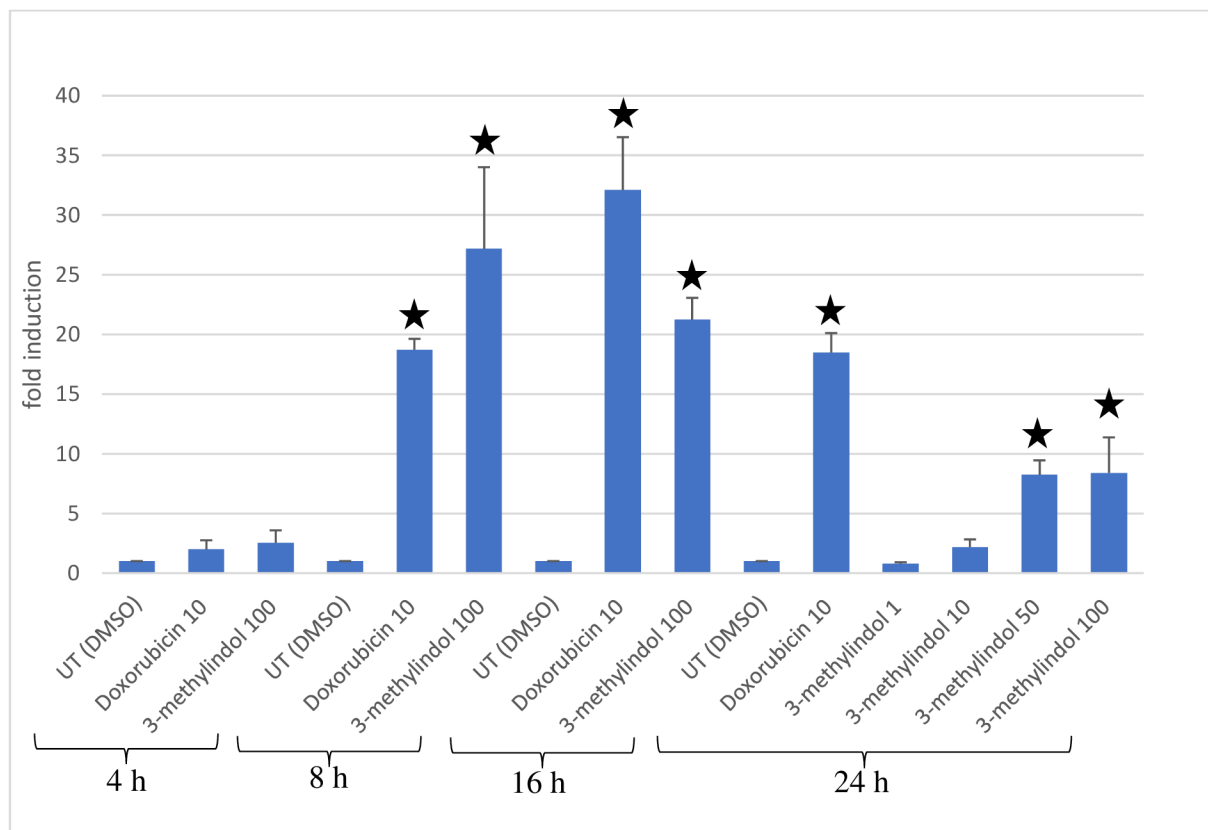


Graf č. 2: Aktivita kaspázy 3 po působení indolových derivátů. Buněčná linie 22Rv1 byla vystavena působením indolovým derivátům o koncentracích $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 24 h. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO a pozitivní kontrolou byl doxorubicin $10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledky jsou násobky negativní kontroly (DMSO) a jsou průměrem z pěti na sobě nezávislých experimentů s vyznačenou směrodatnou odchylkou. Hodnoty označené * jsou signifikantní vůči UT ($p < 0,05$).

Aktivita kaspázy byla zvýšena pouze v buňkách, které byly vystaveny doxorubicinu, jako pozitivní kontrole a 3-methylindolu (graf č. 2). Vzhledem k pozorovaným výsledkům byl v následujících experimentech použit pouze 3-methylindol a ostatní methylové deriváty indolu již použity nebyly.

Po zjištění optimální koncentrace 3-methylindolu a ideální doby působení látky na buňky pro vyvolání maximální indukce aktivity kaspázy 3 byla buněčná linie 22Rv1 vystavena

testované látky o koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 4, 8, 16 a 24 hodin. Při 24h působením látek byly buňky vystaveny koncentrační řadě 3-methylindolu.

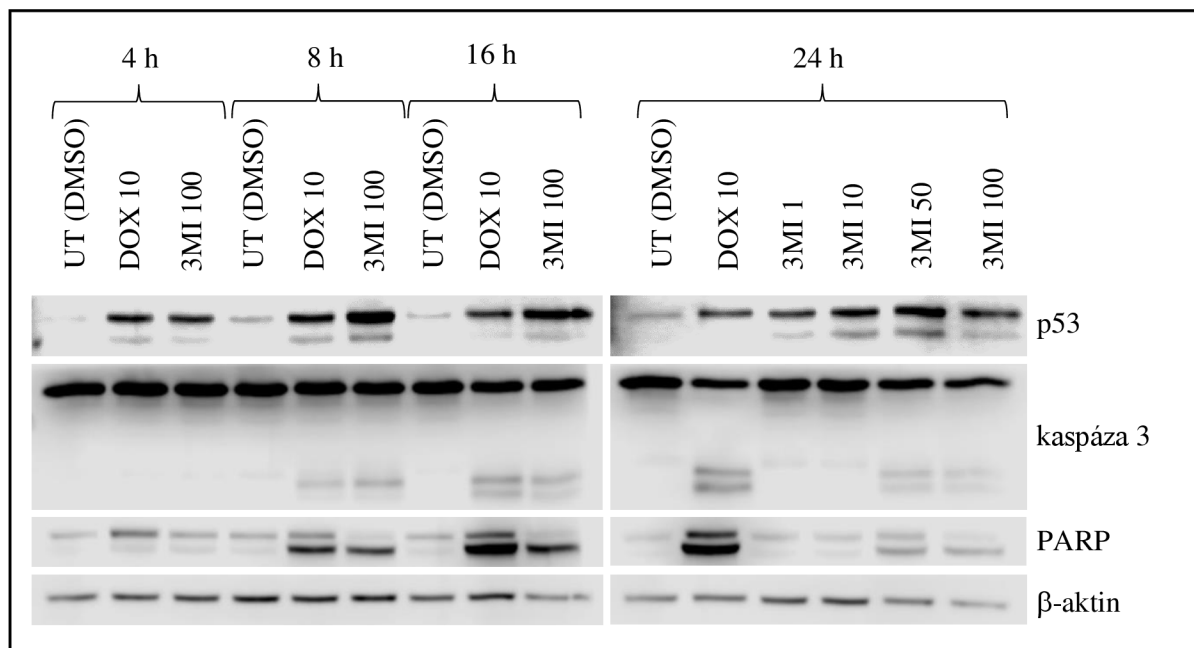


Graf č. 3: Aktivita kaspázy 3 při 4, 8, 16 a 24h inkubaci s 3-methylindolem. Buněčná linie 22Rv1 byla vystaveny působení 3-methylindolu o koncentracích 1, 10, 50 a $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 24 hodin a koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 4, 8 a 16 hodin. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO a pozitivní kontrolou byl doxorubicin $10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledky jsou násobky negativní kontroly (DMSO) a jsou průměrem ze tří na sobě nezávislých experimentů a vyznačenou směrodatnou odchylkou hodnot. Hodnoty označené * jsou signifikantní vůči UT ($p < 0,05$).

Nejvyšší aktivita kaspázy 3 byla naměřena v buňkách, které byly vystaveny 3-methylindolu o koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 8 h, následně pak v 16 h a nejnižší byla za 24h. Pozitivní kontrola doxorubicin dosáhl nejvyšší indukce aktivity kaspázy 3 za 16 h.

7.2. Western Blot

Pro stanovení exprese vybraných genů byly detekovány hladiny příslušných proteinů pomocí metody Western blot. Buněčná linie 22Rv1 byla vystavena 3-methylindolu v koncentracích $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 24 hodin a koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po doby 4, 8 a 16 hodin. Byly detekovány proteiny PARP, p53, kaspáza 3 a β -aktin.



Obrázek č. 5: Vliv skatolu na vybrané apoptotické markery. Buněčná linie 22Rv1 byla ošetřena 3-methylindolem (3MI) o koncentracích $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 24 hodin a koncentrací $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po doby 4, 8 a 16 hodin. Jako negativní kontrola (UT) sloužilo DMSO a jako pozitivní kontrola doxorubicin (DOX, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Reprezentativní Western blot detekce jednotlivých proteinů v buněčné linii 22Rv1 ze třech provedených experimentů.

3-methylindol o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ indukoval p53 ve srovnání s negativní kontrolou ve všech testovaných časech. V delším čase, 24 h, byla pozorována indukce i u nejnižší koncentrace. Kaspáza 3 a protein PARP, které jsou přítomny v neaktivní formě ve všech buňkách buněčné linie 22Rv1, byly v naštípané (aktivní) formě detekovány především v buňkách ošetřených $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 3-methylindolem po dobu 8, 16 a 24 h a také v buňkách ošetřených $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 3-methylindolem po dobu 24 h. Množství štěpené kaspázy 3 tak koreluje s aktivitou naměřenou dříve (graf č. 3).

8. DISKUSE

Cílem této bakalářské práce bylo prokázat, že vybrané testované indolové deriváty vyvolávají v buňkách rakoviny prostaty genotoxické poškození a následnou indukci apoptotických drah. Na základě výsledků výzkumu (Zgarbová *et Vrzal*, 2023) bylo vybráno 13 indolových derivátů, které vykazaly agonistické chování vůči AhR a antagonistické vůči AR.

Na začátku experimentů bylo nutné provést optimalizaci pracovního postupu „Caspase 3 assay“ z pohledu doby inkubace destičky před měřením fluorescence. Pomocí kinetického měření byla měřena intenzita fluorescence odpovídající aktivitě kaspázy 3. Jak je vidět z grafu č. 1, tak po jedné hodině kinetického měření byla intenzita fluorescence přibližně 9krát vyšší než na začátku měření, proto byla při následujících experimentech destička hodinu inkubována ve tmě za pokojové teploty.

Dalším krokem bylo sledování vlivu pozice methylové skupiny v molekule indolu na indukci apoptotických drah v buněčné linii 22Rv1. Výsledky experimentu ukázaly, že apoptotické dráhy byly indukovány pouze v buňkách ošetřených 3MI, proto byl pro další experimenty použit pouze 3MI. Výsledky následných experimentů ukazují, že nejvyšší aktivita kaspázy 3 byla naměřena u buněk vystavených 3MI ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) po dobu 8 a 16 hodin. Ve srovnání se studií (Nachshon-Kedmi *et al.*, 2004), kde sledovali aktivitu kaspázy 3 u buněčné linie PC-3 po vystavení 3,3'-diindolylmethanu (DIM) o koncentraci $75 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 0, 8, 16, 24, 48 a 72 hodin, byla nejvyšší aktivita naměřena při 72 hodinách. Rozdíly ve výsledcích mohou být zapříčiněny použitím různých indolových derivátů, kdy DIM je v podstatě strukturně zdvojený 3MI, a různých buněčných linií, kdy minimálně zásadní rozdíly leží v absenci AR a p53 v PC-3.

Aktivita kaspázy 3 je spojena s proteiny p53 a PARP. Protein p53 hraje důležitou roli ve spuštění apoptotických drah následkem genotoxického poškození, proto byla sledována jeho indukce v buňkách vystavených 3MI. Z výsledků z Western blot detekce bylo zjištěno, že protein p53 byl indukován ve všech buňkách ošetřených 3MI, což odpovídá výsledkům publikovaných ve studii (Weems *et al.*, 2009), kde sledovali vliv 3MI na buněčnou linii lidských bronchiálních epitelových buněk NHBE. Ve studii zjistili, že 3MI má genotoxický vliv na buňku a způsobuje jednovláknové zlomy v DNA, které vedou k fosforylaci (stabilizaci) p53. Ze studie vyplývá, že k indukci p53 dochází zhruba již do 1 hodiny od vystavení buněk 3MI, což se shoduje s mými výsledky.

PARP protein v buňce opravuje poškozenou DNA a je přítomen ve všech buňkách, ale zároveň je exekučními kaspázami štěpen na neaktivní formy. Z výsledků mnou provedených experimentů je pozorována naštípaná neaktivní forma především v buňkách ošetřené 3MI o koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 8, 16 a 24 hodin a v koncentraci $50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po dobu 24 hodin. Ve srovnání se studií (Nachshon-Kedmi *et al.*, 2003), kde sledovali štěpení PARP u buněčné linie DU145 po působení $75 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DIM, zjistili že DIM vede ke štěpení PARP po 8, 16 a 24 hodinách, což potvrzuje mnou získané výsledky. Ve studii (Weems *et al.*, 2009) pozorovali štěpení PARP po vystavení buněčné linie NHBE 3-methylindolu o koncentracích 100 a $200 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, což potvrzuje vyvolání genotoxického poškození vlivem 3MI.

Z toho vyplývá, že 3MI vyvolává genotoxické poškození, které vede k indukci p53 a následnému spuštění apoptotických drah, což je dokázané aktivní exekuční kaspázou 3, která štěpí PARP. Jelikož kaspáza 3 může být aktivována iniciačními kaspázami z vnitřní nebo vnější apoptotické dráhy, tak by se následný výzkum mohl zabývat zkoumáním, jakou dráhou probíhá apoptóza vyvolaná 3MI.

Krom výše uvedeného, porovnání vlivu 3MI na různé nádorové prostatické linie z hlediska indukce apoptózy, může naznačit, co je klíčovou komponentou, která rozhoduje o toxicitě skatolu. K zamyšlení jistě stojí i to, zda vyšší hladina skatolu je pozitivně korelována s nižší incidencí rakoviny prostaty a zda či jak lze modulací střevní mikrobioty tohoto stavu dosáhnout. Toto ovšem již vyžaduje rozsáhlou epidemiologickou studii.

9. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabývala vlivem methylových derivátů indolu na buňky rakoviny prostaty (22Rv1), u kterých jsem sledovala indukci apoptózy prostřednictvím hladiny s apoptózou spojených proteinů (p53, PARP, kaspáza 3). Z vybraných 13 testovaných látek byla zjištěna indukce apoptózy pouze u jedné z nich, a to u 3-methylindolu. Následné experimenty odhalily vztah mezi dobou inkubace, koncentrací látky a aktivitou kaspázy 3. Nejvyšší hladiny kaspázy 3 byly pozorovány u buněk vystavených 3MI ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) po dobu 8 a 16 hodin.

Při Western blot detekci proteinů bylo potvrzeno, že nejvyšší nárůst hladiny aktivní kaspázy 3 byl v buňkách ošetřených $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 3MI po dobu 8, 16 a 24 h, a také v buňkách ošetřených $50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 3MI po dobu 24 h. Detekce proteinů p53 a naštípané neaktivní formy PARP potvrdili, že v buňkách došlo vlivem 3MI, o koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při působení po dobu 8, 16 a 24 hodin, ke genotoxickému poškození vedoucímu k indukci apoptotických drah.

10. LITERATURA

- Bandini M. (2013): Electrophilicity: the “dark-side” of indole chemistry. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **11**: 5206–50212.
- Barluenga J., Valdés C. (2011): Five-Membered Heterocycles: Indole and Related Systems In: Alvarez-Builla, Julio, Juan Jose Vaquero a José Barluenga, ed. *Modern Heterocyclic Chemistry*, pp. 377–531, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim.
- Ben-Salem S., Balaji Venkadakrishnan V. (2021): Novel insights in cell cycle dysregulation during prostate cancer progression. *Endocrine-Related Cancer*, **28**: 141–155.
- Boulos S., Mazhar D. (2017): The evolving role of chemotherapy in prostate cancer. *Future Oncology*, **13**: 1091–1095.
- Byun Y., Chen F., Chang R., Trivedi M., Green K. J., Cryns V. L. (2001): Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, **8**: 443–450.
- Coleman M. L., Sahai E. A., Yeo M., Bosch M., Dewar A., Olson M. F. (2001): Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*, **3**: 339–345.
- Deveraux Q. L. (1999): Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *The EMBO Journal*, **18**: 5242–5251.
- Dewson G., Kluck R. M. (2009): Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Science*, **122**: 2801–2808.
- Egevad L., Delahunt B., Evans A. J., Grignon D. J., Kench J. G., Kristiansen G., Leite K. R., Samaratunga H., Srigley J. R. (2016): International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading of Prostate Cancer. *American Journal of Surgical Pathology*, **40**: 858–861.
- Eisenstein M. (2022): A better way to biopsy in prostate cancer. *Nature*, **609**: 34–35.
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**: 43–50.

- Fu Y., Sun P., Li G., He R., Shi L., Xing N. (2022): Recent advances in the synthetic method and mechanism for the important N-heterocyclic compound of 3-methylindole. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **59**: 1135–1143.
- Gay H. A., Michalski J. M. (2018): Radiation therapy for prostate cancer. *Mo Med.*, **2018**: 146-150.
- Gyrd-Hansen M., Darding M., Miasari M., Santoro M. M., Zender L., Xue W., Tenev T., da Fonseca P. C. A., Zvelebil M., Bujnicki J. M., Lowe S., Silke J., Meier P. (2008): IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- κ B as well as cell survival and oncogenesis. *Nature Cell Biology*, **10**: 1309–1317.
- Hellerstedt B. A., Pienta K. J. (2002): The Current State of Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **52**: 154–179.
- Ittmann M. (2018): Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **8**: 1–6.
- Kasisvisvanathan V., Rannikko A. S., Borghi M., Panebianco V., Mynderse L. A., Vaarala M. H., Briganti A., Budäus L., Hellawell G., Hindley R. G., Roobol M. J., Eggener S., Ghei M., Villers A., Bladou F., Villeirs G. M., Viridi J., Boxler S., Robert G., Singh P. B., Venderink W., Hadaschik B. A., Ruffion A., Hu J. C., Margolis D., Crouzet S., Klotz L., Taneja S. S., Pinto P., Gill I., Allen C., Giganti F., Freeman A., Morris S., Punwani S., Williams N. R., Brew-Graves Ch., Deeks J., Takwoingi Y., Emberton M., Moore C. M. (2018): MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *New England Journal of Medicine*, **378**: 1767–1777.
- Kaushik N., Kaushik N., Attri P., Kumar N., Kim Ch., Verma A., Choi E. (2013): Biomedical Importance of Indoles. *Molecules*, **18**: 6620–6662.
- Kischkel F. C., Lawrence D. A., Tinel A., LeBlanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D., Ashkenazi A. (2001): Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 46639–46646.
- Kothakota S., Azuma T., Reinhard Ch., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T. J., Kirschner M. W., Kohts K., Kwiatkowski D. J., Williams L. T. (1997): Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science*, **278**: 294-298.

- Liu Y., Pei Z., Pan T., Wang H., Chen W., Lu W. (2023): Indole metabolites and colorectal cancer: Gut microbial tryptophan metabolism, host gut microbiome biomarkers, and potential intervention mechanisms. *Microbiological Research*, **272**: 1–11.
- Loeb S., Catalona W. J. (2009): What is the role of digital rectal examination in men undergoing serial screening of serum PSA levels?. *Nature Clinical Practice Urology*, **6**: 68–69.
- Millán M. M., Castañeda S. (2014): Sex Hormones and Related Compounds, Including Hormonal Contraceptives. In: *A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions*, pp. 615–634, Elsevier.
- McNeal J. E. (1981): The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, **2**: 35–49.
- Nachshon-Kedmi M., Yannai S., Haj A., Fares F.A. (2003): Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, **41**: 745–752.
- Nachshon-Kedmi M., Yannai S., Fares F. A. (2004): Induction of apoptosis in human prostate cancer cell line, PC3, by 3,3'-diindolylmethane through the mitochondrial pathway. *British Journal of Cancer*, **91**: 1358–1363.
- Nichols W. K. (2002): 3-Methylindole-Induced Toxicity to Human Bronchial Epithelial Cell Lines. *Toxicological Sciences*, **71**: 229–236.
- Pezaro C., Woo H. H., Davis I. D. (2014): Prostate cancer: measuring PSA. *Internal Medicine Journal*, **44**: 433–440.
- Rebello R. J., Oing Ch., Knudsen K. E., Loeb S., Johnson D. C., Reiter R. E., Gillessen S., Van der Kwast T., Bristow R. G. (2021): Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, **7**: 1–27.
- Roos W. P., Kaina B. (2006): DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*, **12**: 440–450.
- Roth W., Reed J. C. (2004): FLIP Protein and TRAIL-Induced Apoptosis. *TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)*, **67**: 189–206.
- Saelens X., Festjens N., Walle L. V., Gorp M. van, Loo G. van, Vandenabeele P. (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23**: 2861–2874.

- Schatten H. (2018): Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. In: SCHATTEN, Heide, ed. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*, pp. 1–14, Springer International Publishing.
- Schendel S. L., Xie Z., Montal M. O., Matsuyama S., Montal M., Reed J. C. (1997): Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**: 5113–5118.
- Schug Z. T., Gonzalez F., Houtkooper R. H., Vaz F. M., Gottlieb E. (2011): BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death & Differentiation*, **18**: 538–548.
- Slee E. A., Adrain C., Martin S. J. (2001): Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 7320–7326.
- Sprick M. R., Weigand M. A., Rieser E., Rauch Ch. T., Juo P., Blenis J., Krammer P. H., Walczak H. (2000): FADD/MORT1 and Caspase-8 Are Recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and Are Essential for Apoptosis Mediated by TRAIL Receptor 2. *Immunity*, **12**: 599–609.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**: 209–249.
- Vanags D. M., Pörn-Ares M. I., Coppola S., Burgess D. H., Orrenius S. (1996): Protease Involvement in Fodrin Cleavage and Phosphatidylserine Exposure in Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **271**: 31075–31085.
- Vyhlídalová B., Poulíková K., Bartoňková I., Krasulová K., Vančo J., Trávníček Z., Mani S., Dvořák Z. (2019): Mono-methylindoles induce CYP1A genes and inhibit CYP1A1 enzyme activity in human hepatocytes and HepaRG cells. *Toxicology Letters*, **313**: 66–76.
- Wang M., Xie X., Wells D., Higgins C. (2017): Robotic surgical system for radical prostatectomy: a health technology assessment. *Ont Health Technol Assess Ser.*, **2017**: 1-172.

- Weems J. M., Cutler N. S., Moore Ch., Nichols W. K., Martin D., Makin E., Lamb J. G., Yost G. S. (2009): 3-Methylindole is Mutagenic and a Possible Pulmonary Carcinogen. *Toxicological Sciences*, **112**: 59–67.
- Zgarbová E., Vrzal R. (2023): The Impact of Indoles Activating the Aryl Hydrocarbon Receptor on Androgen Receptor Activity in the 22Rv1 Prostate Cancer Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**: 1–18.
- Zhu Y., Liu Ch., Nadiminty N., Lou W., Tummala R., Evans Ch. P., Gao A. C. (2013):. Inhibition of ABCB1 Expression Overcomes Acquired Docetaxel Resistance in Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, **12**: 1829–1836.